Disclaimer

Für die Vollständigkeit und Richtigkeit der einzelnen Inhalte der „Entwicklungsbiologie für BScBiol/BScMLS/BA“ kann keine Gewähr übernommen werden. Es ist nicht gestattet, diese Vorlesung oder Teile derselben ohne ausdrückliche Genehmigung der Dozentinnen und Dozenten für die Wiedergabe im Druck, Vorträge oder eine andere Art der Veröffentlichung, auch nicht im Internet, zu verwenden. Für Teile der Abbildungen liegen die Rechte bei Buchverlagen, wissenschaftlichen Zeitschriften oder bei den Dozentinnen und Dozenten dieser Veranstaltung.

Arp Schnittger

Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Universität Hamburg
Bachelorstudiengang Biologie

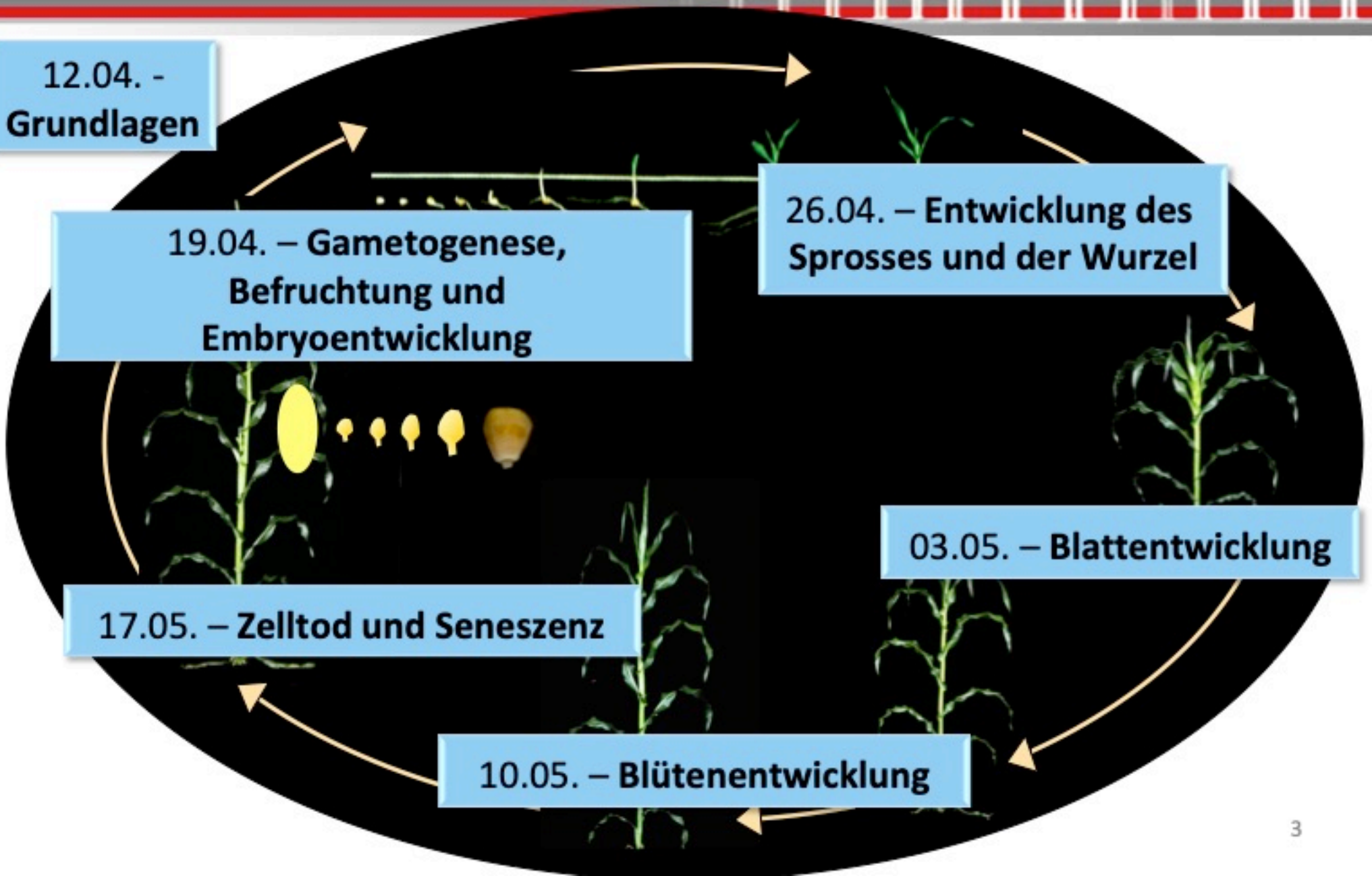
Entwicklungsbiologie

Sommersemester 2021

Arp Schnittger
Biozentrum Klein Flottbek

arp.schnittger@uni-hamburg.de

Vorlesung Entwicklungsbiologie SoSe 2021


12.04. - Grundlagen
19.04. – Gametogenese, Befruchtung und Embryoentwicklung
26.04. – Entwicklung des Sprosses und der Wurzel
03.05. – Blattentwicklung
10.05. – Blütenentwicklung
17.05. – Zelltod und Seneszenz

Konzepte

- Lebenszyklus der Pflanze
- Entwicklung des weiblichen Gametophyten
- Entwicklung des männlichen Gametophyten
- Bestäubung und Befruchtung
- Frühe Embryogenese

Methodik in dieser Vorlesung

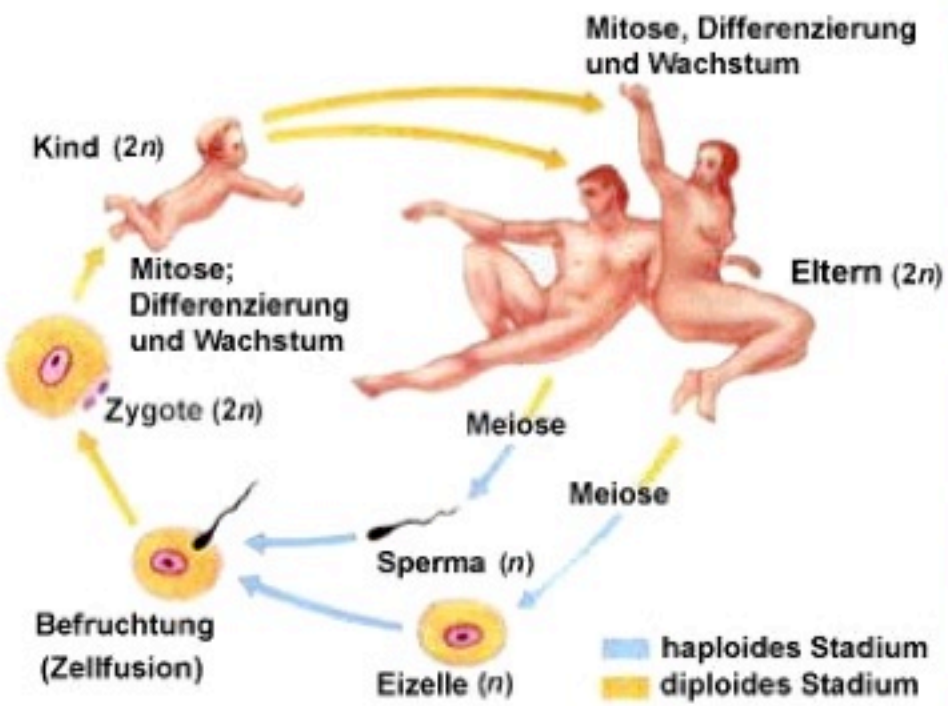
Laser dissection microscopy

Tetradenanalyse der Meiose

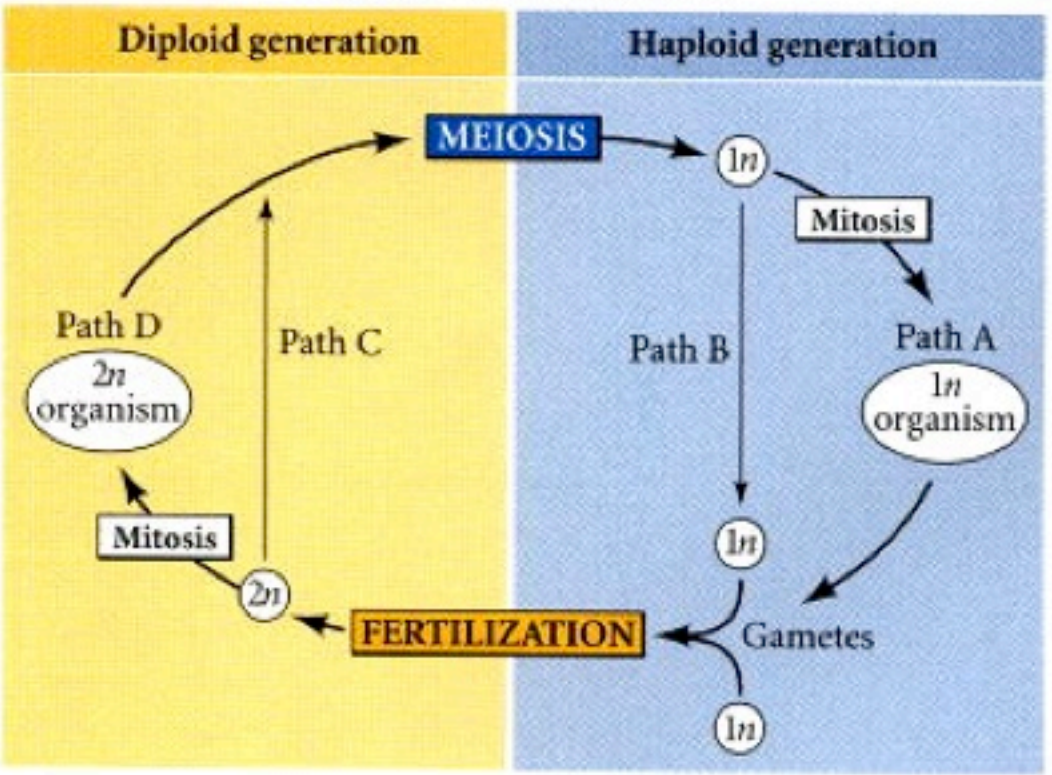
Laserablation

Markergene

Typischer Generationszyklus von Tieren

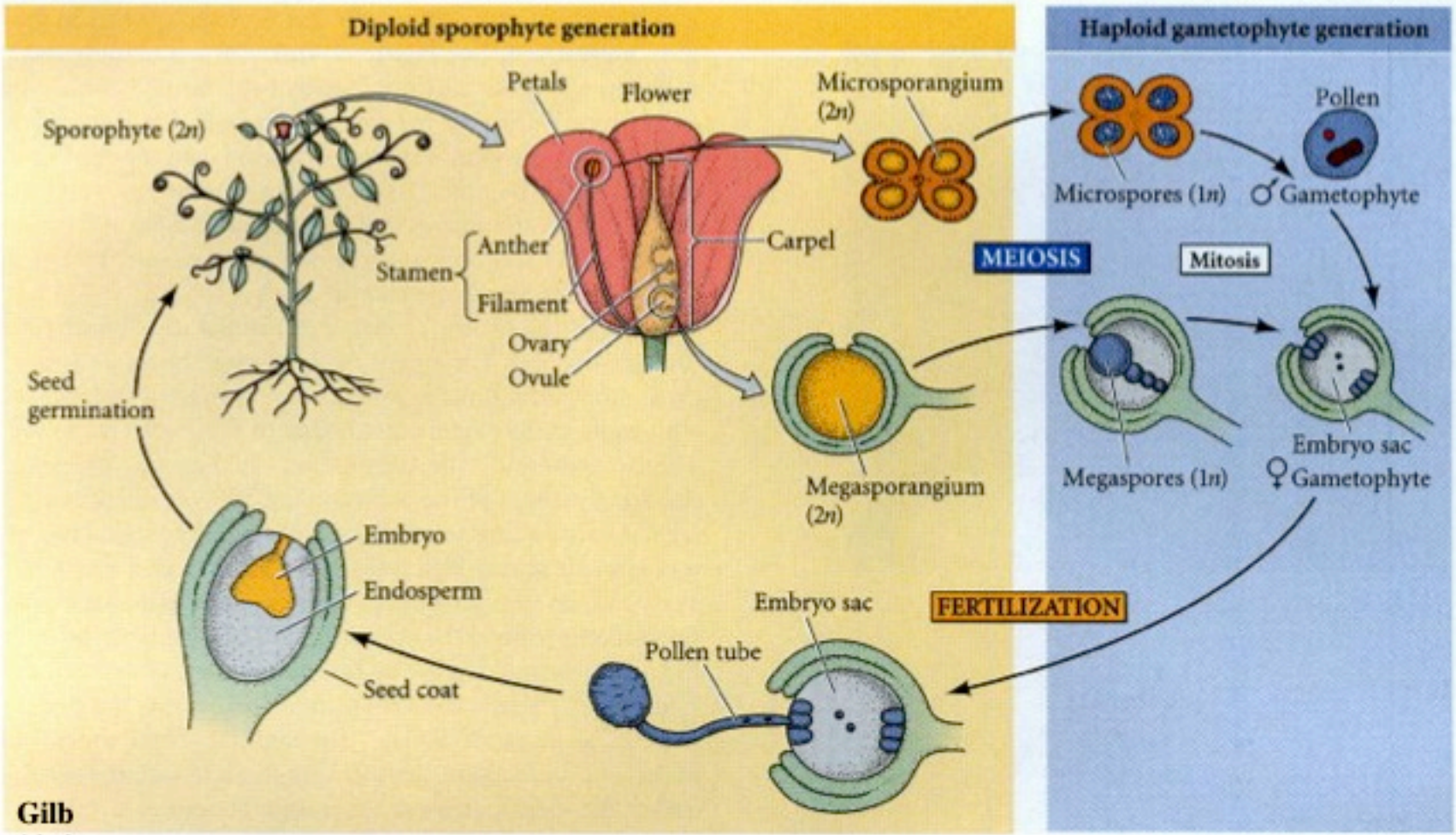


gametische Meiose



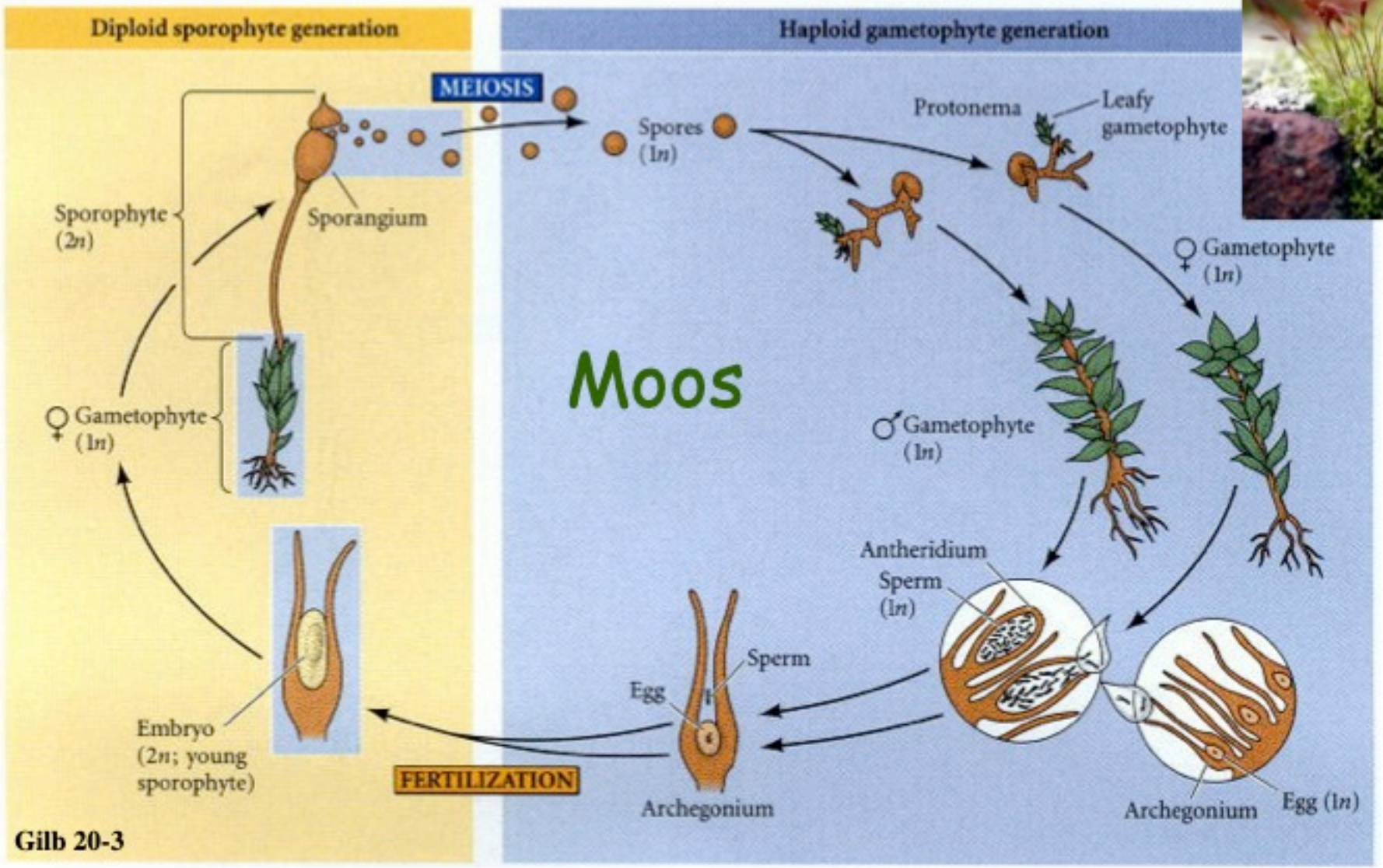
Generationszyklus von Pflanzen I: Angiosperme/Bedecktsamer

gametophytische Meiose



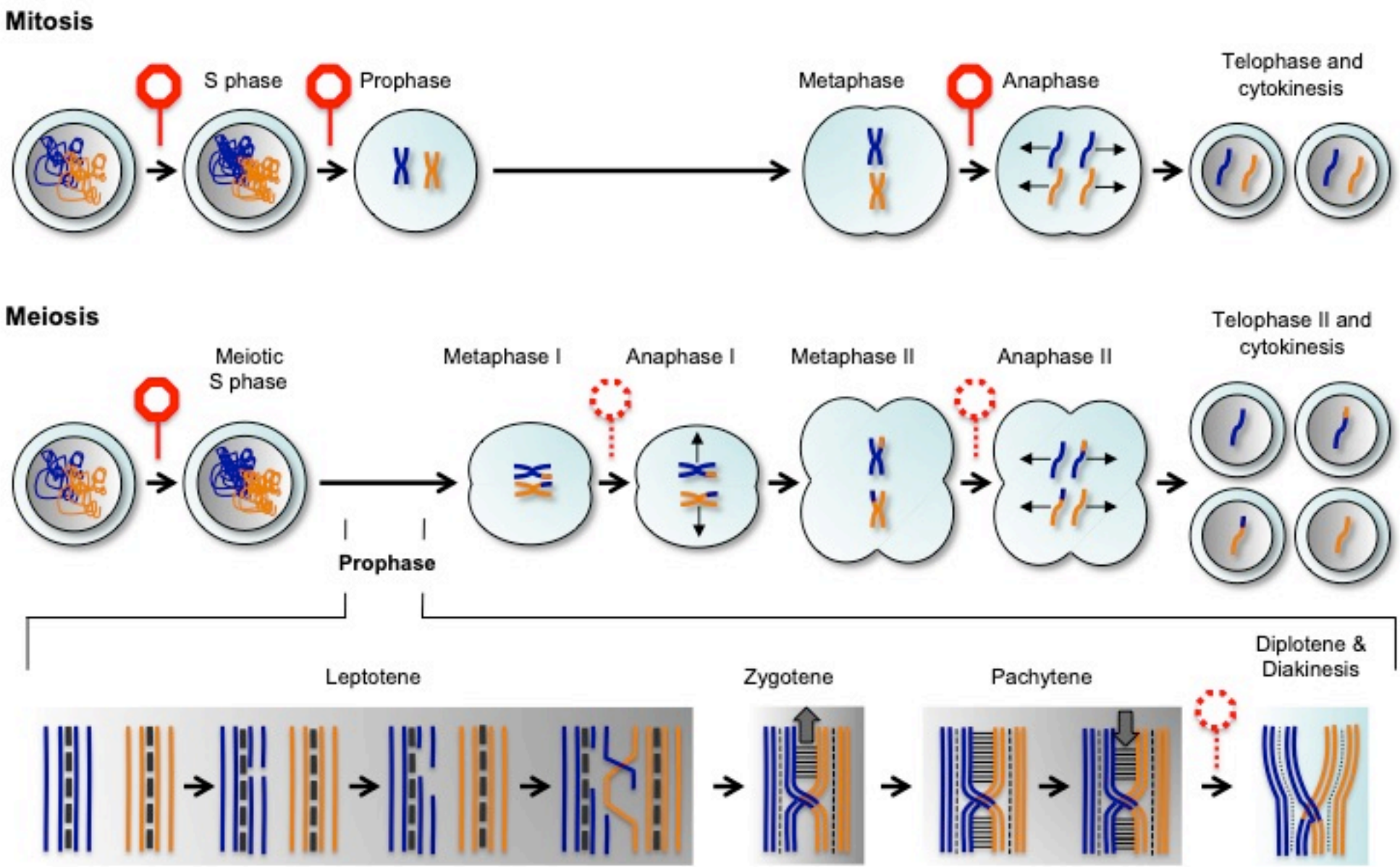
Generationszyklus von Pflanzen II: Moos

gametophytische Meiose

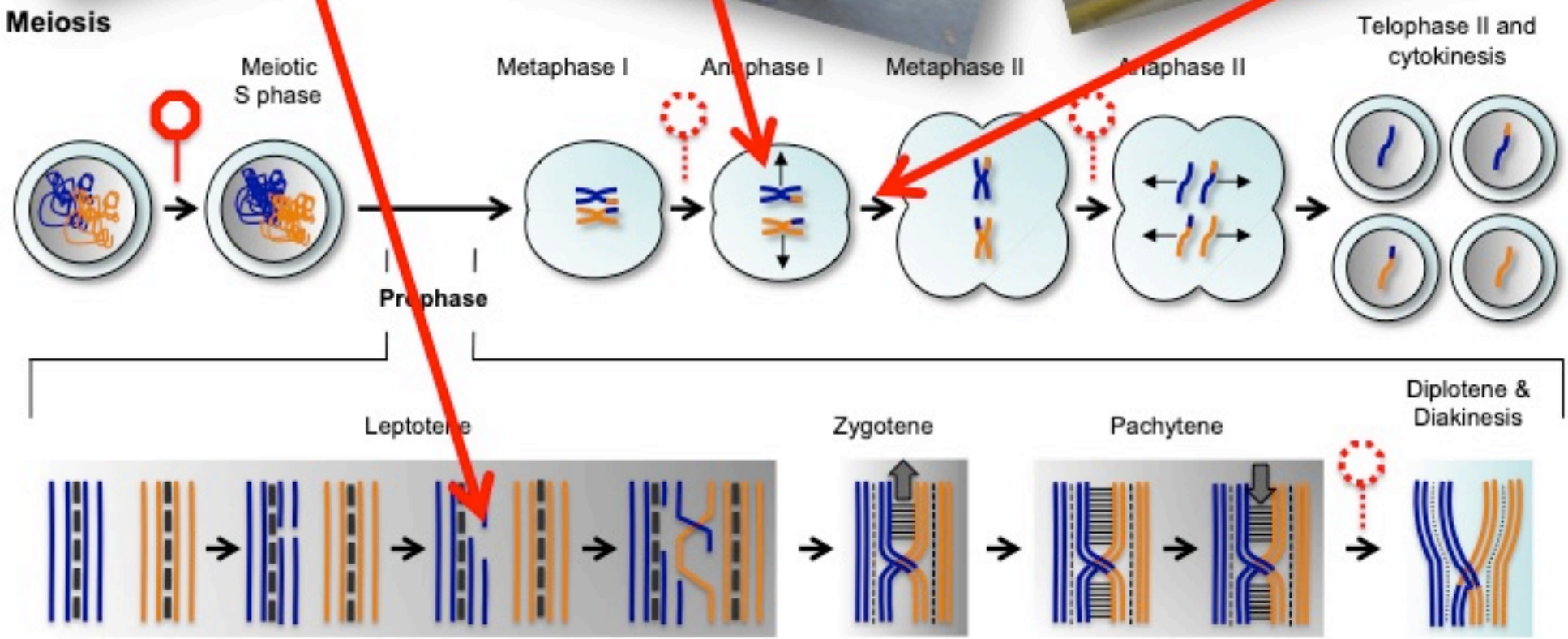


Gilb 20-3

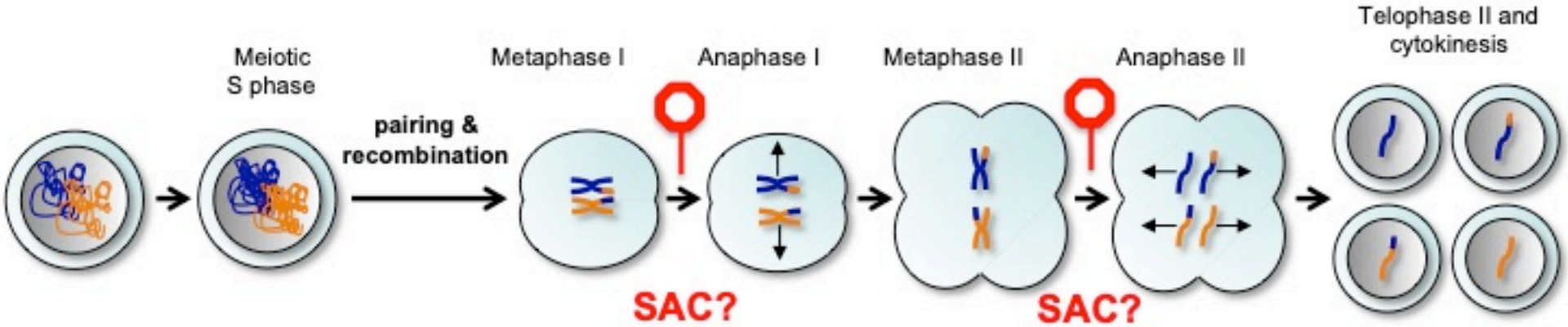
Meiosis: breaking all rules of the cycle



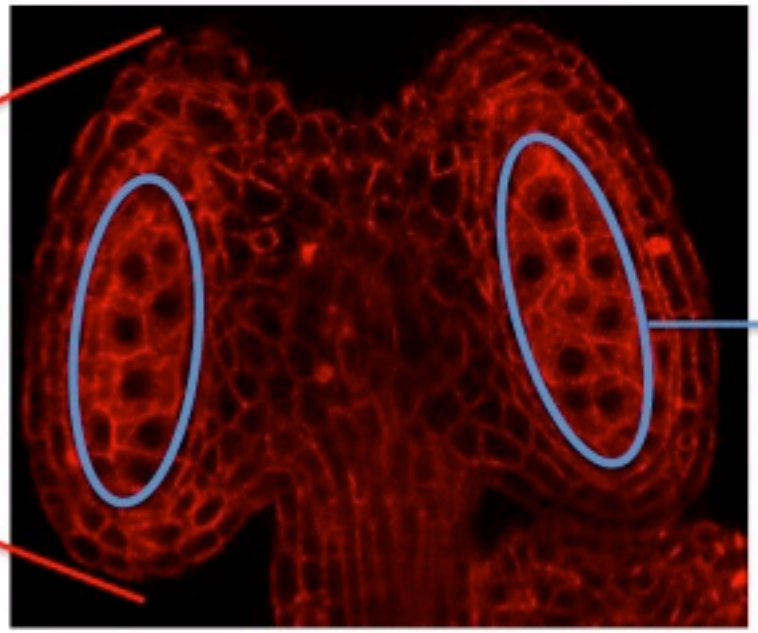
Meiosis: breaking all rules of the cycle



Lebendbeobachtung der Meiose in Arabidopsis

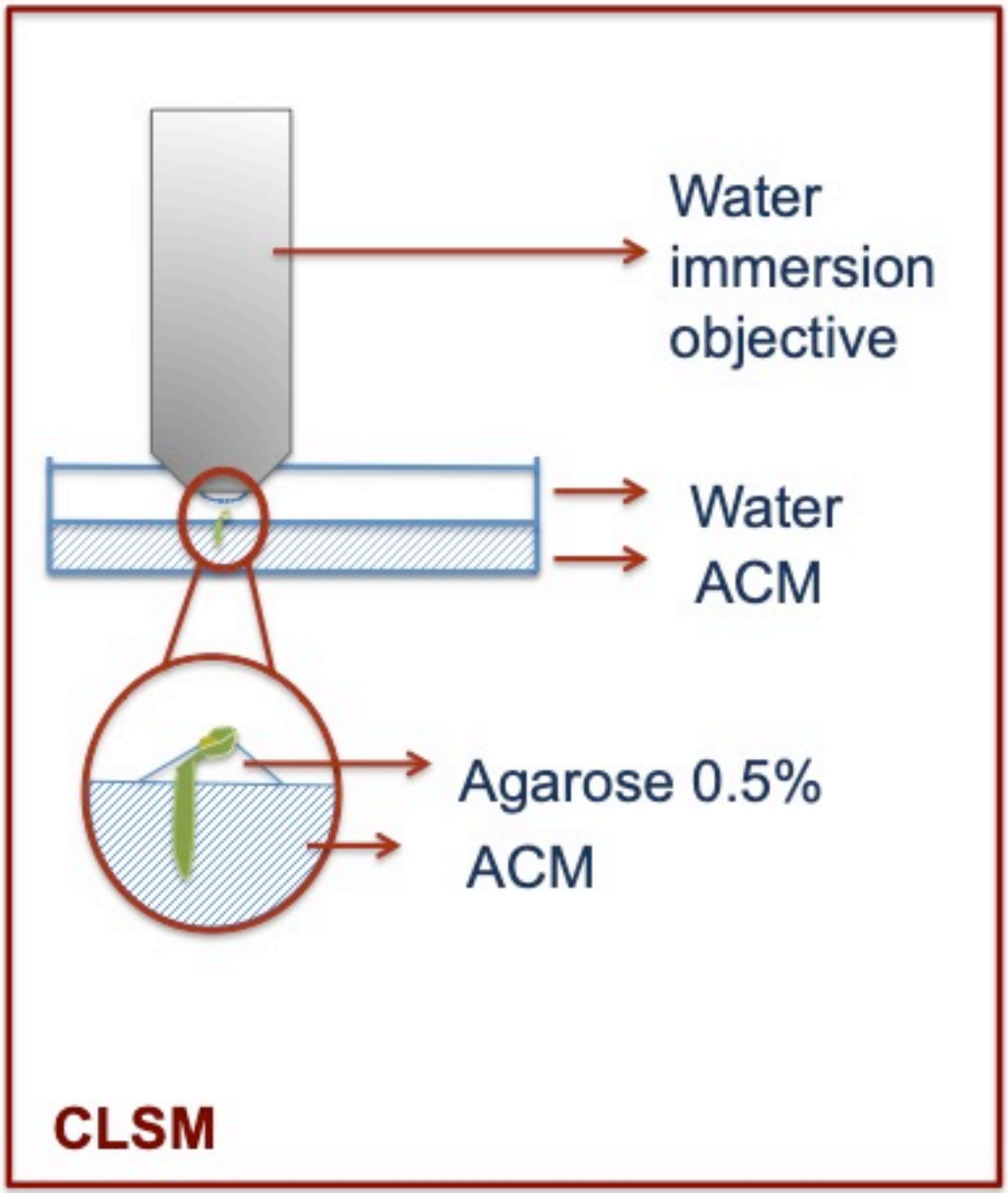


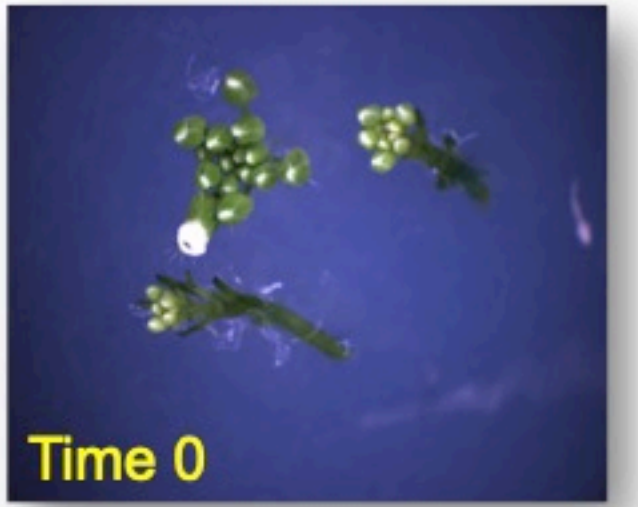
flower stage 9 (according to Smyth et al. 1990)



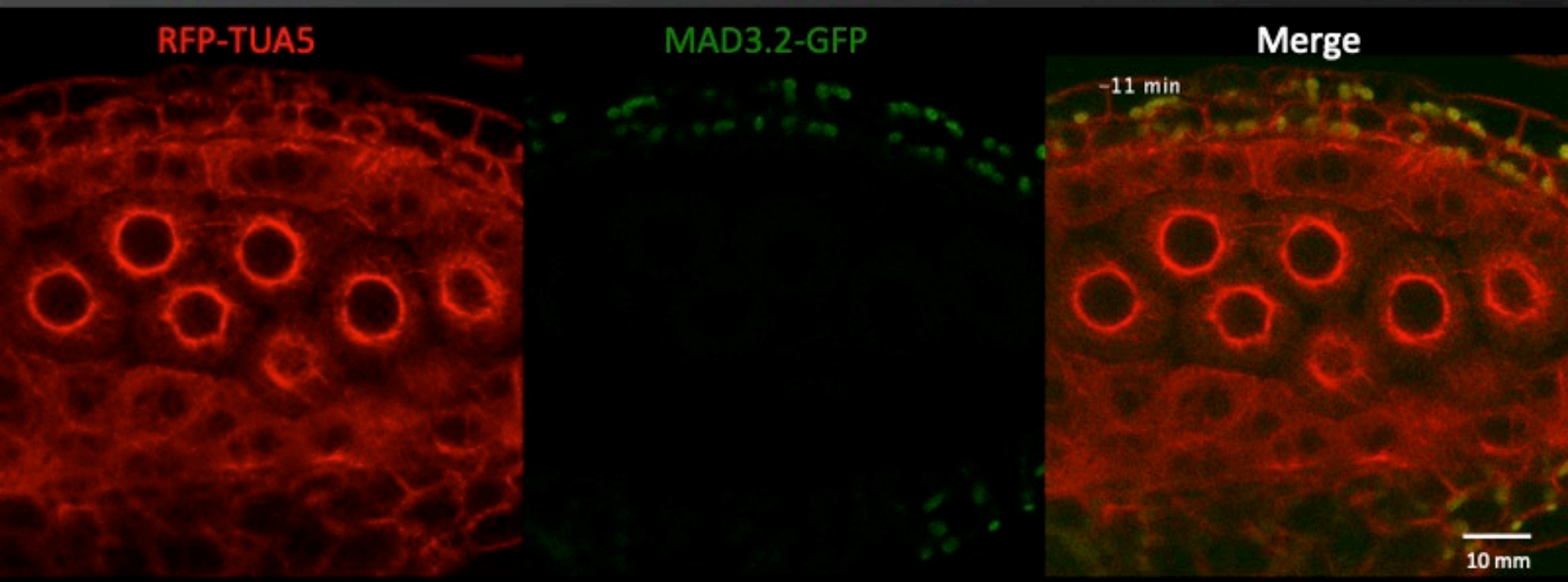
young anther

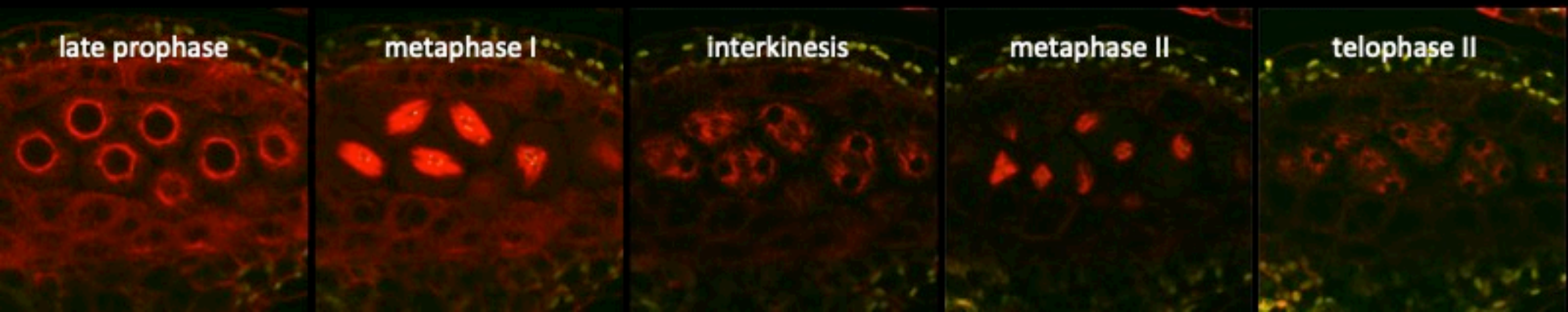
Lebendbeobachtung der Meiose in Arabidopsis





Lebendbeobachtung der Meiose in Arabidopsis

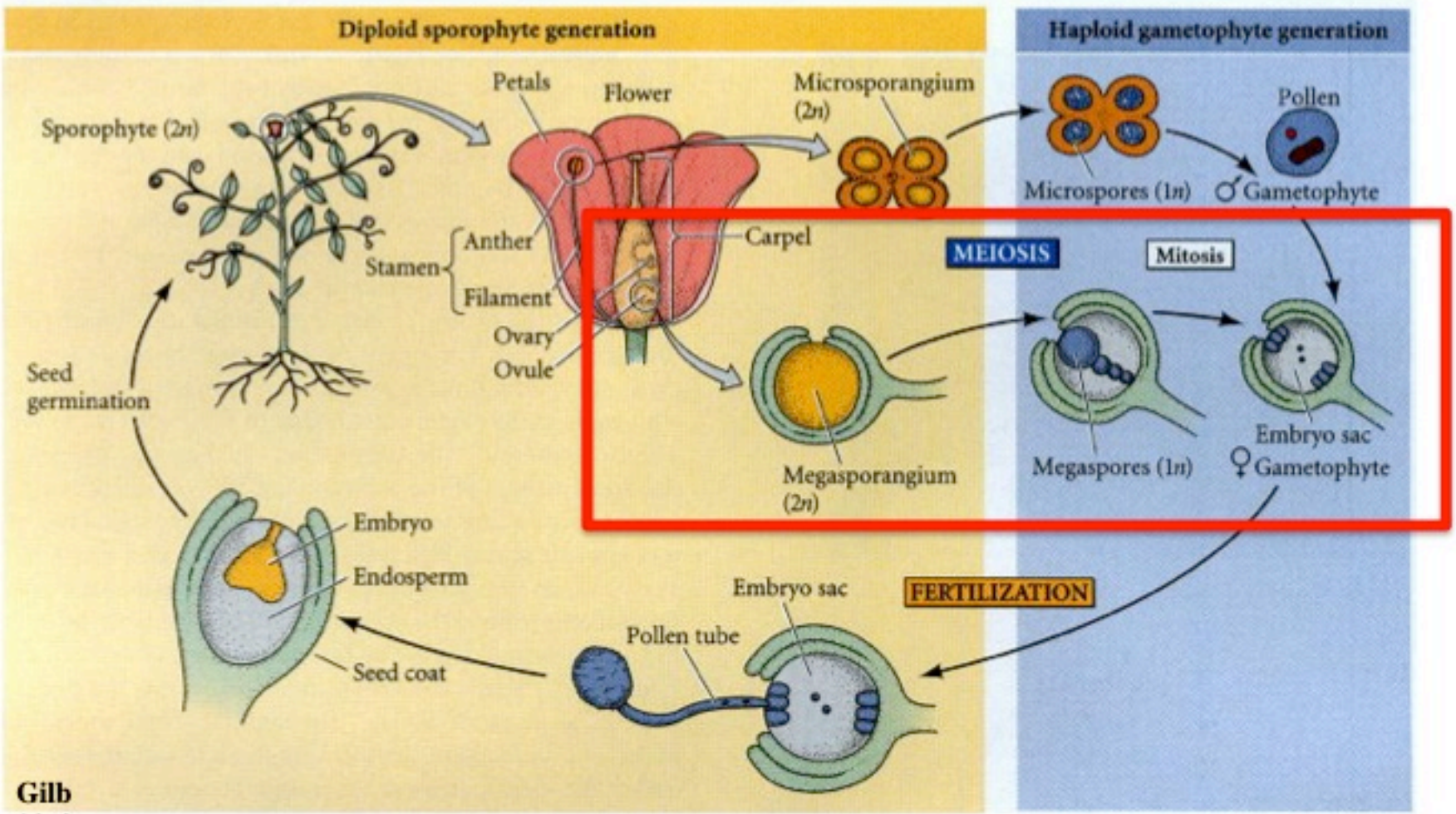




Grundlagen und Konzepte

- Lebenszyklus der Pflanze
- **Entwicklung des weiblichen Gametophyten**

Entwicklung des weiblichen Gametophyten



Embryonalentwicklung Tier versus Pflanze

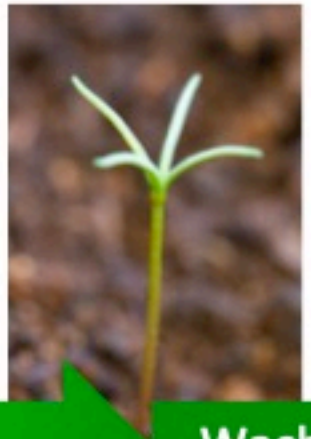
befruchtete Eizelle

Embryogenese

Wachstum

birth/
germination

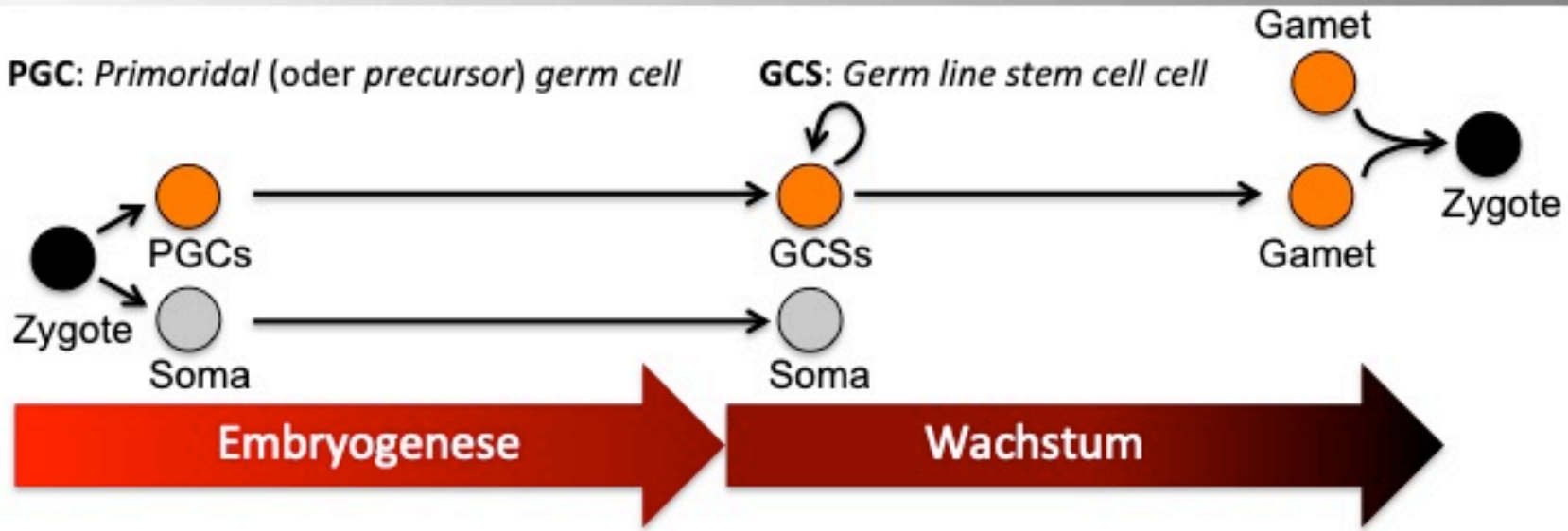
befruchtete Eizelle



Embryogenese

Wachstum & Organogenese

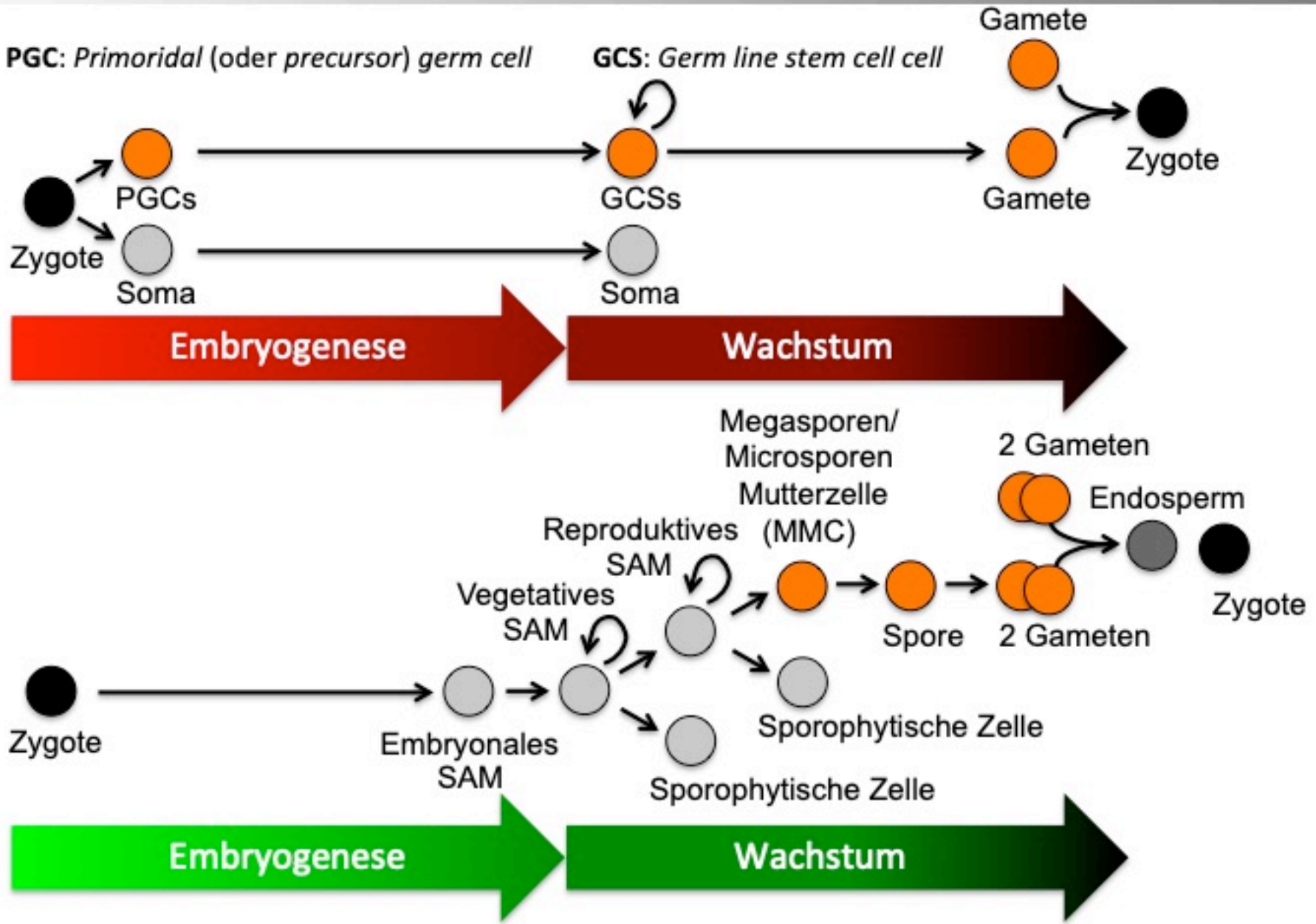
Keimbahnentwicklung in Tieren versus Pflanzen



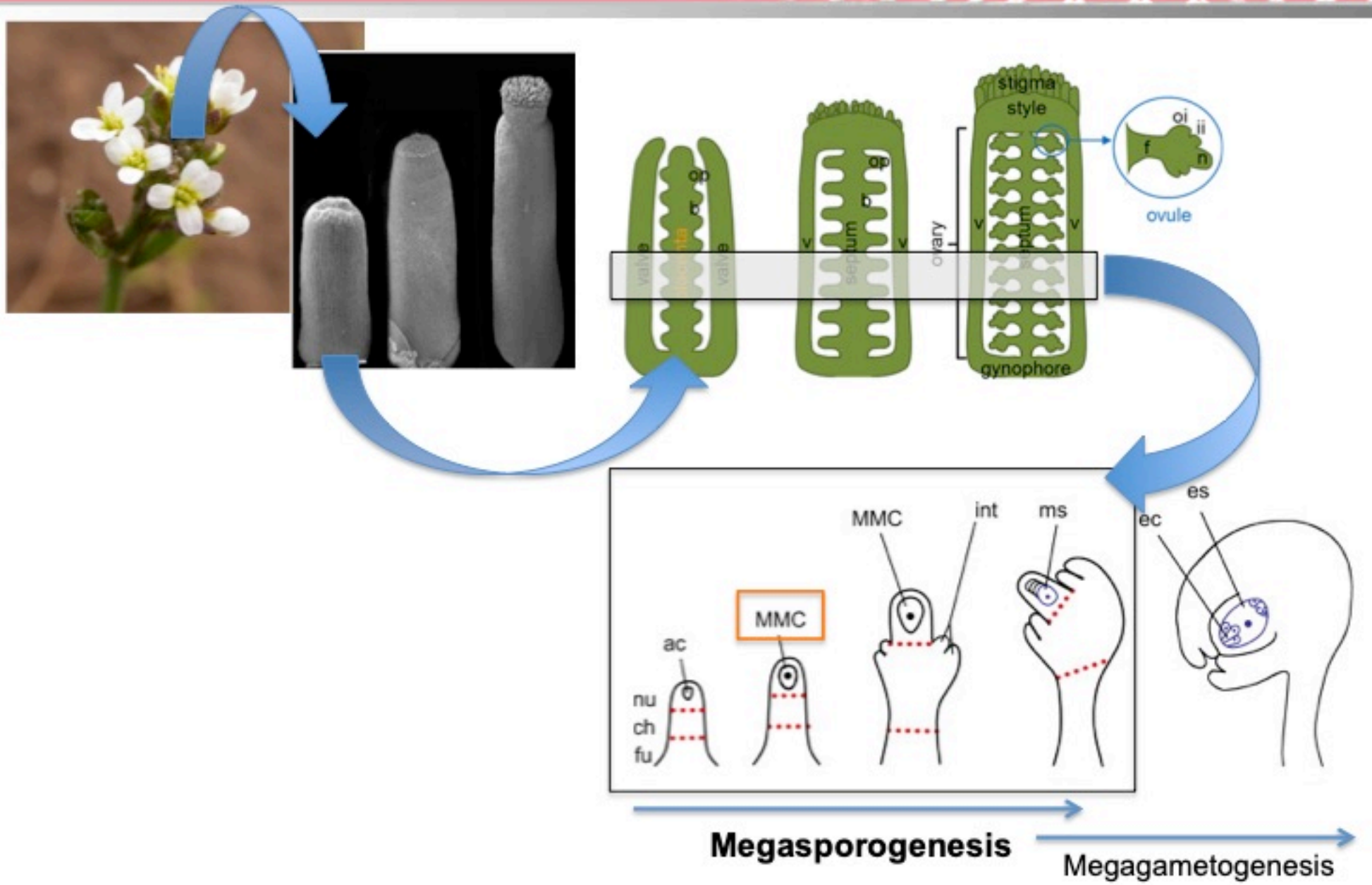
Keimbahn: ist eine **direkte Zellfolge** in der Entwicklung **vielzelliger** Organismen, aus der die **Keimzellen** (generative Zellen, Gameten) hervorgehen.

Das Konzept der Keimbahn wurde in den **1880er** Jahren von **August Weismann** entwickelt.

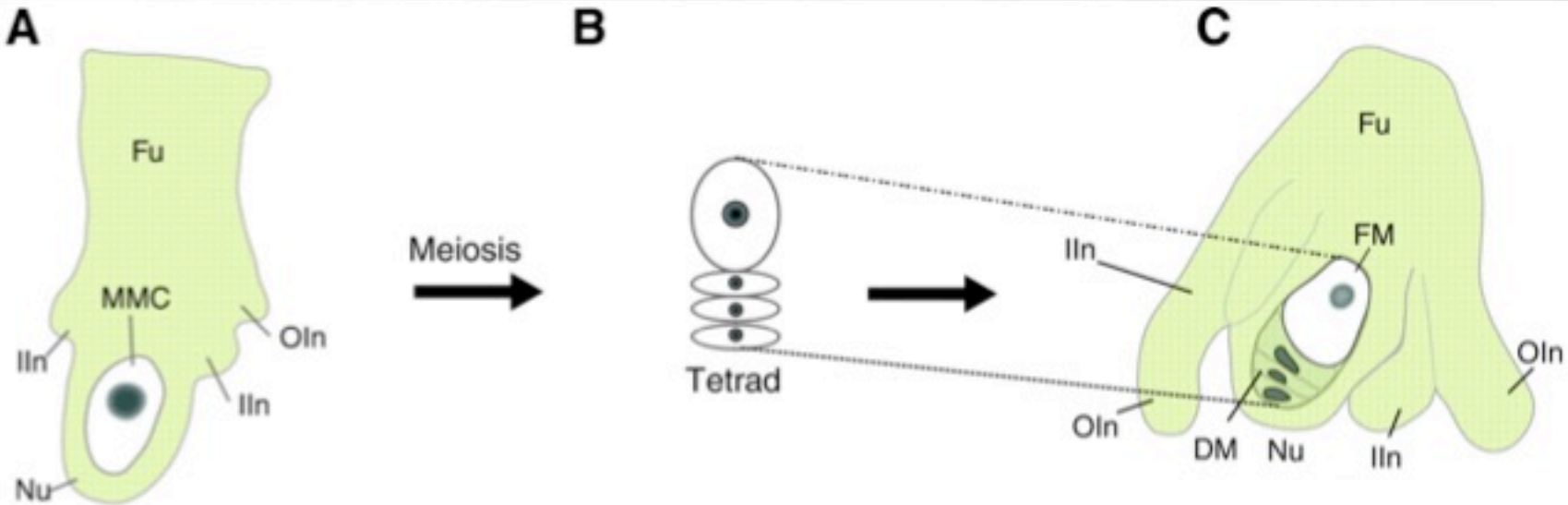
Keimbahnentwicklung in Tieren versus Pflanzen



Megagametogenese und Megasporogenese in Arabidopsis

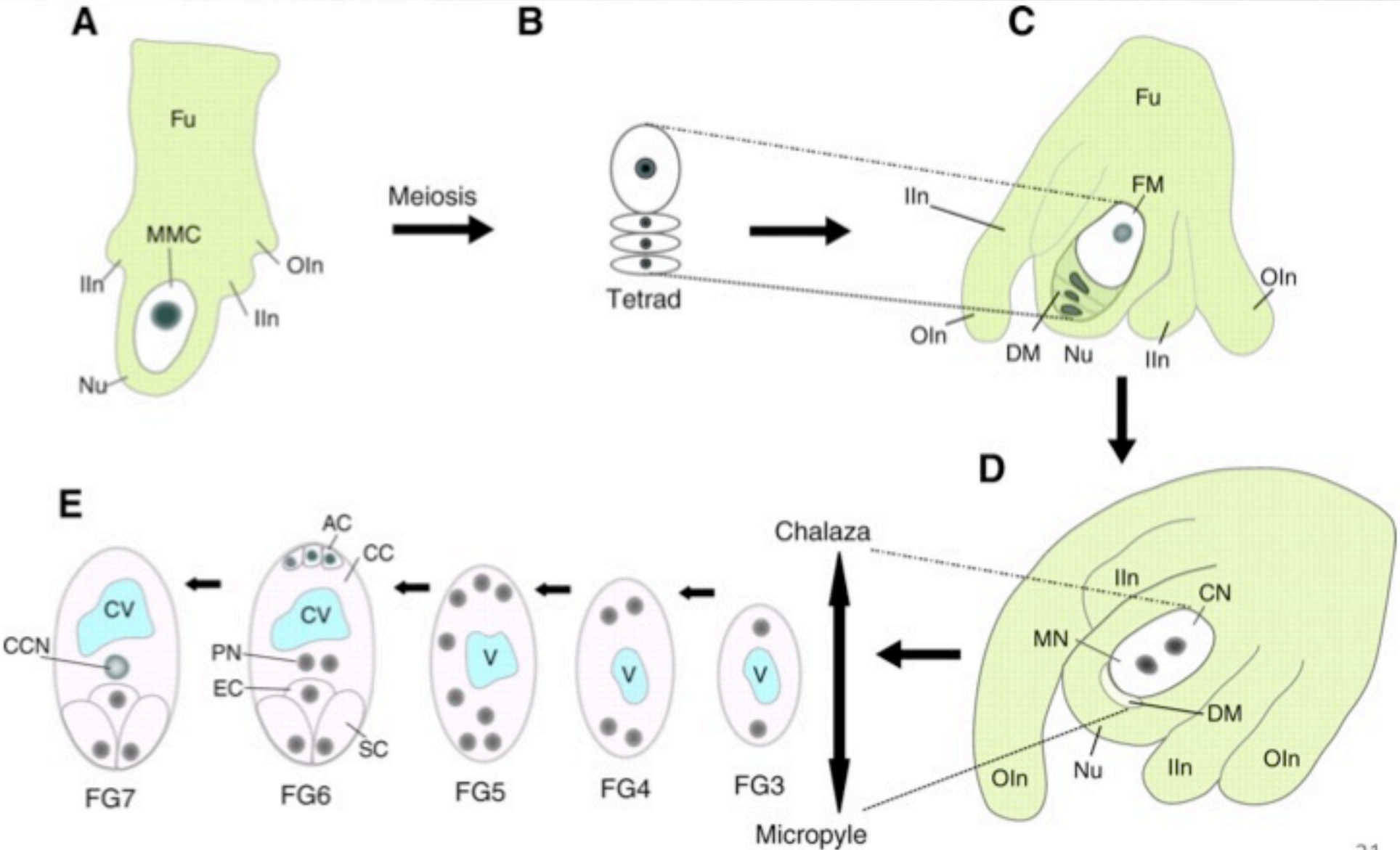


Megagametogenese kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden



entnommen aus Sundaresan, V. und Alandete-Saez, M. Development 2010 137: 179-189; doi: 10.1242/dev.030346

Megagametogenese kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden

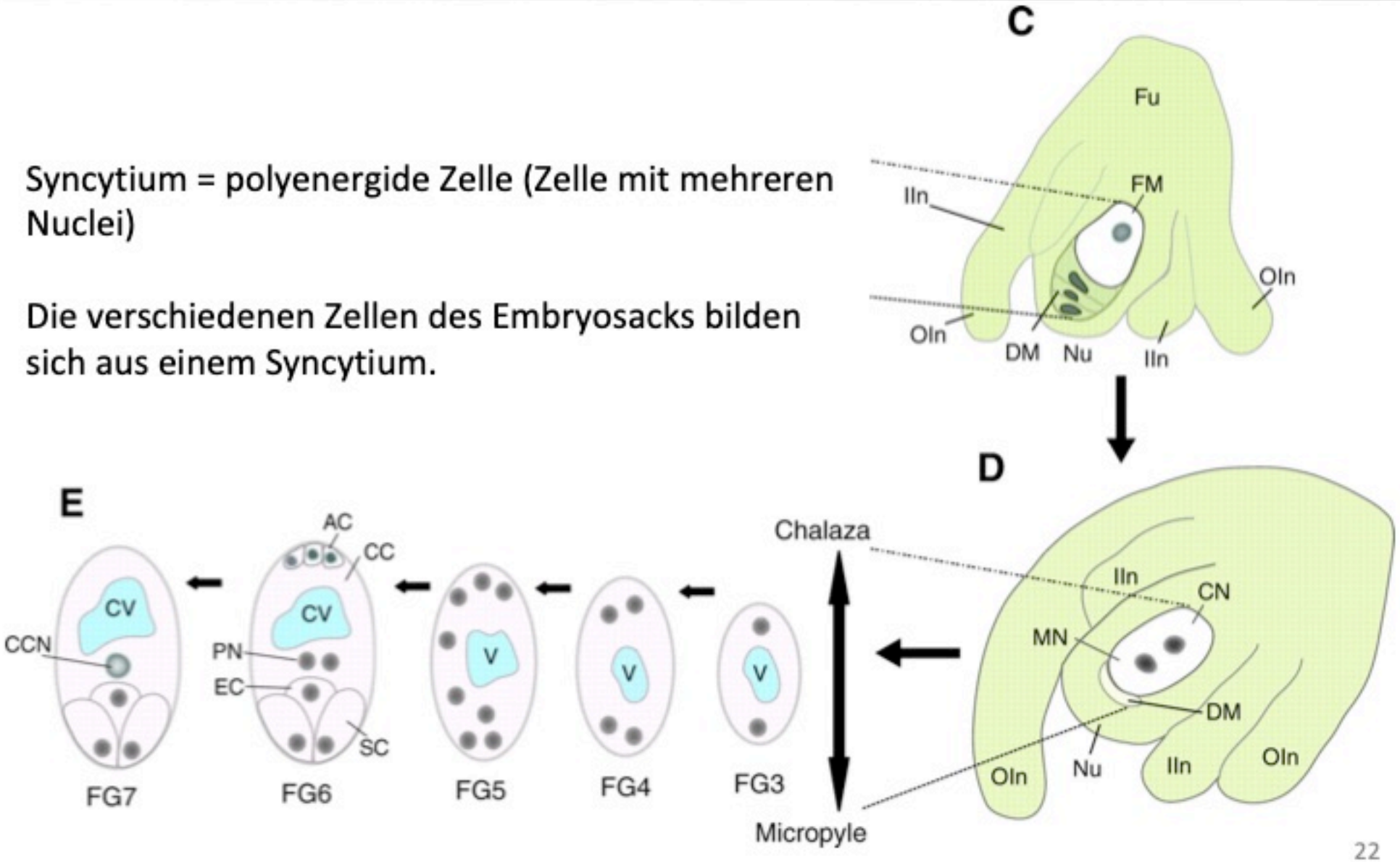


entnommen aus Sundaresan, V. und Alandete-Saez, M. Development 2010 137: 179-189; doi: 10.1242/dev.030346

Megagametogenese kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden

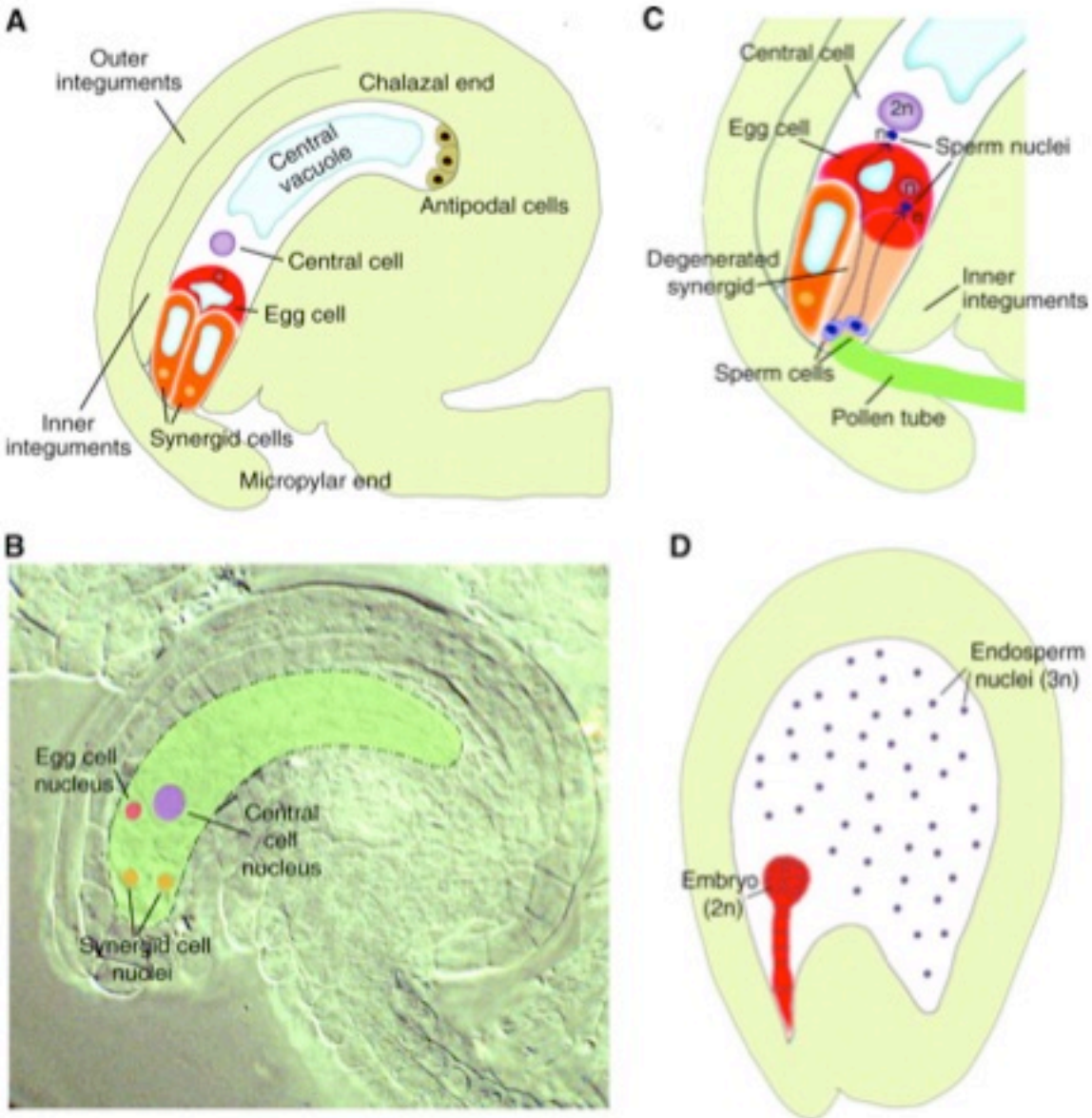
Syncytium = polyenergide Zelle (Zelle mit mehreren Nuclei)

Die verschiedenen Zellen des Embryosacks bilden sich aus einem Syncytium.



entnommen aus Sundaresan, V. und Alandete-Saez, M. Development 2010 137: 179-189; doi: 10.1242/dev.030346

Das Ergebnis: Ein Embryosack



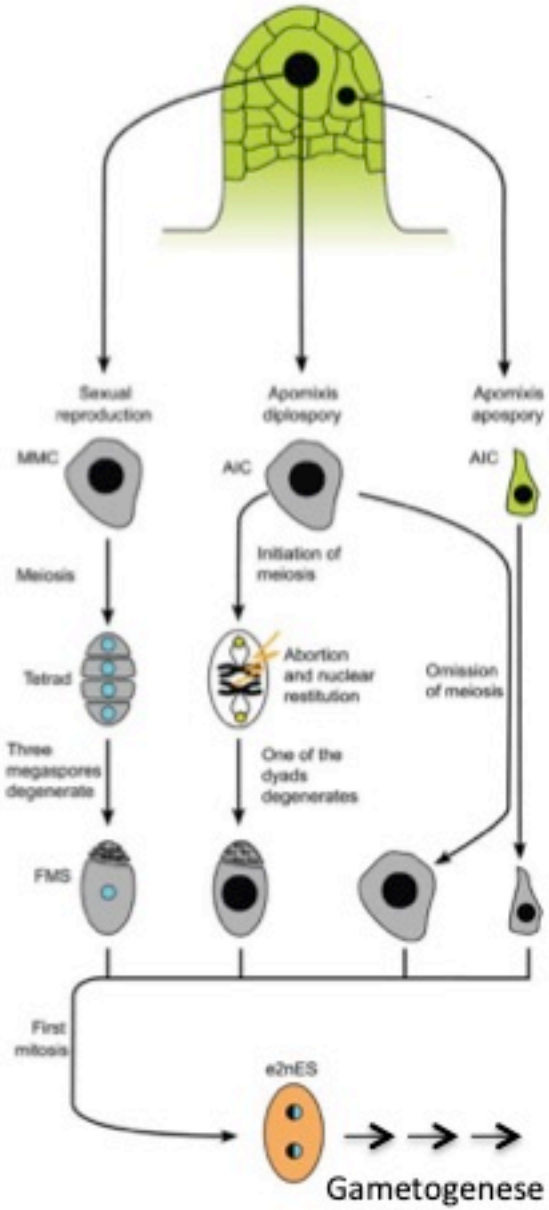
entnommen aus Sundaresan, V. und Alandete-Saez, M. Development 2010 137: 179-189; doi: 10.1242/dev.030346

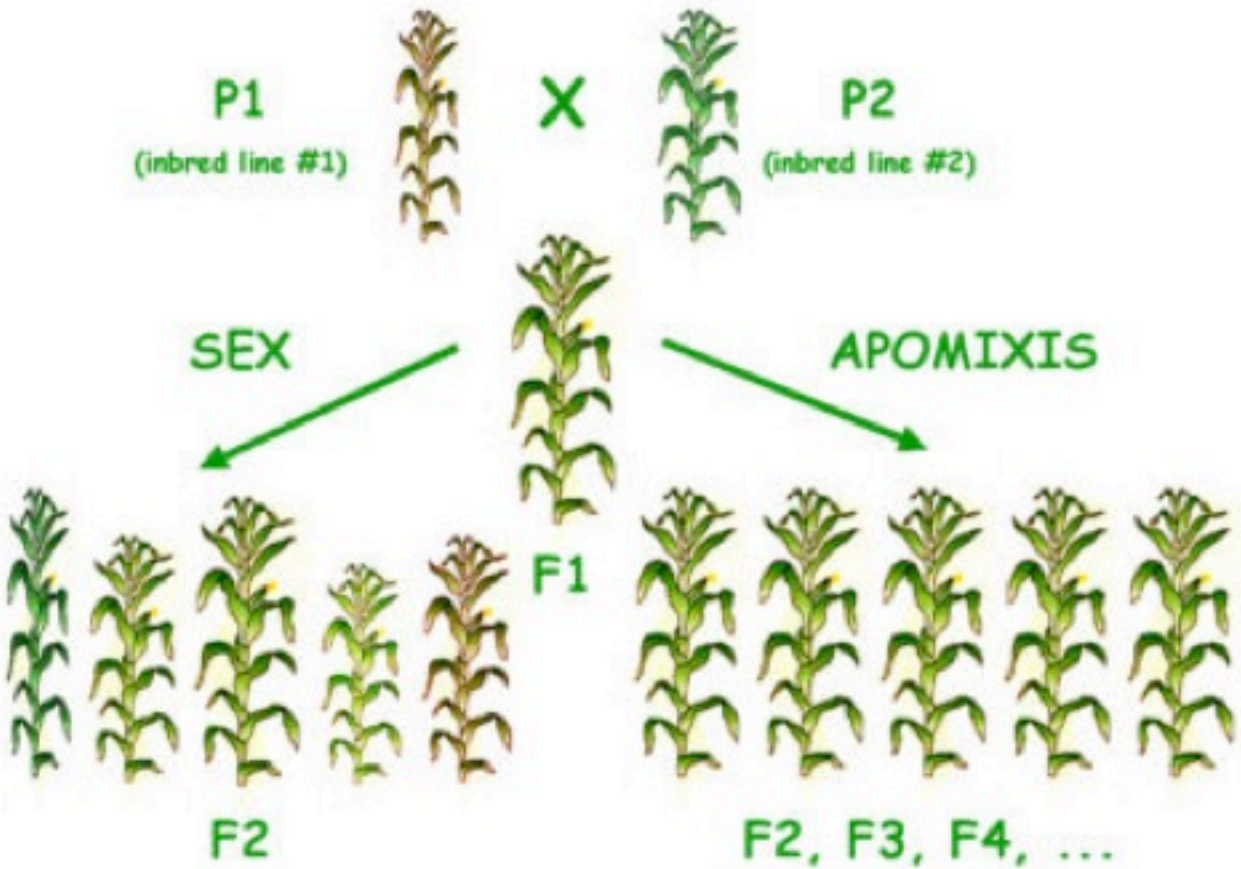
Zwei zentrale Fragen

1. Wie wird die Meiozyte (Megasporenmutterzelle) spezifiziert? Und wie wird der Eintritt in die Meiose reguliert?

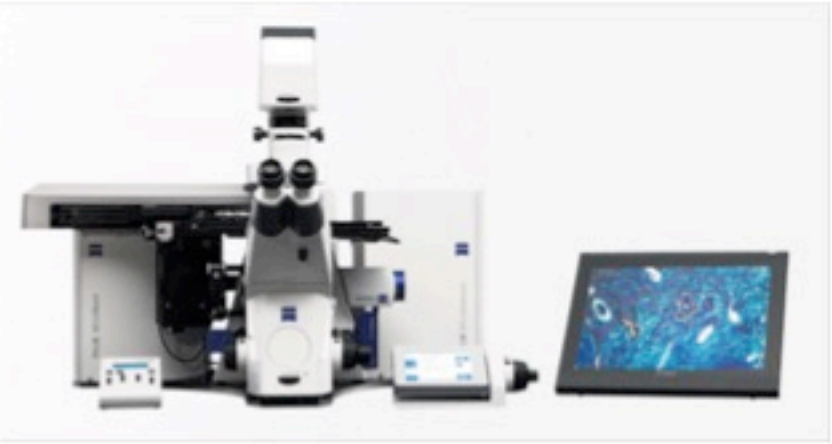
2. Wie werden die verschiedenen Zellen des Embryosacks spezifiziert?

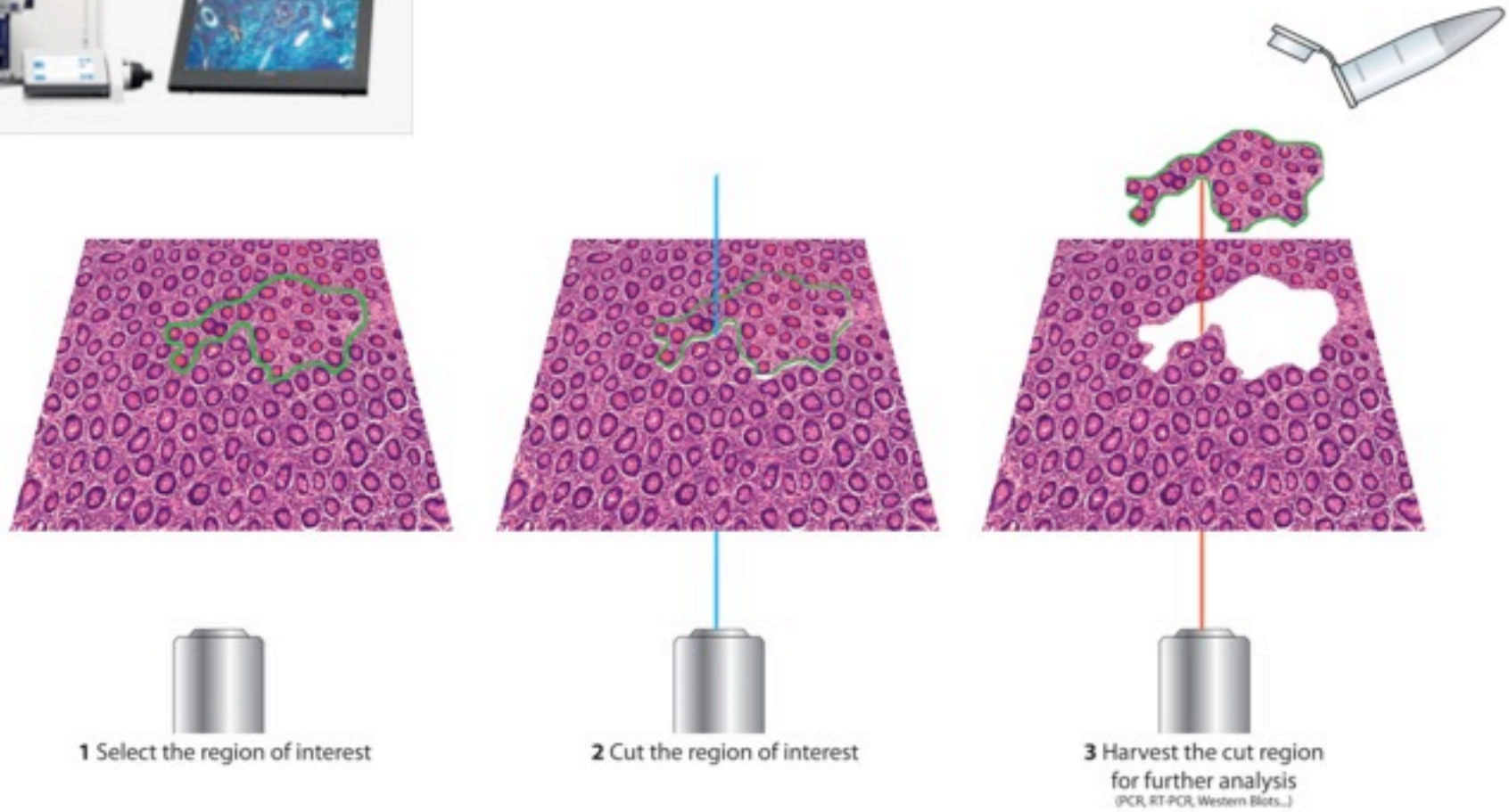
Apomixis


Sexual reproduction
Apomixis diplospory
Apomixis apospory
MMC
AIC
AIC
Meiosis
Initiation of meiosis
Tetrad
Abortion and nuclear restitution
Omission of meiosis
Three megaspores degenerate
One of the dyads degenerates
FMS
First mitosis
e2nES
Gametogenese


P1
(inbred line #1)
X
P2
(inbred line #2)
SEX
APOMIXIS
F1
F2
F2, F3, F4, ...

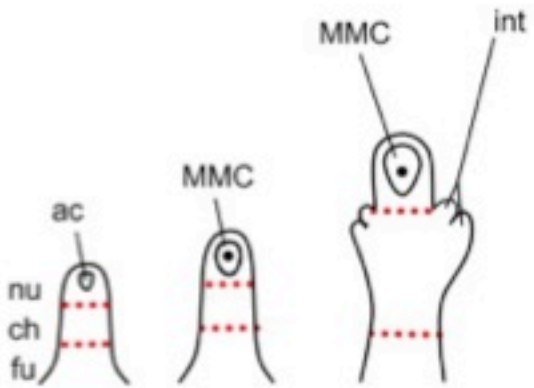
Laser dissection microscopy (LDM)

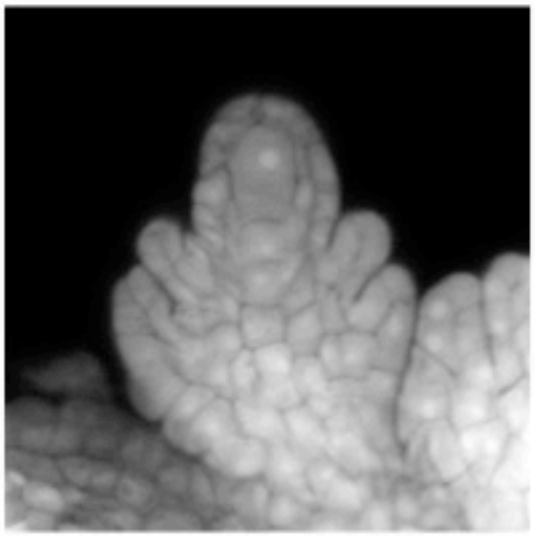


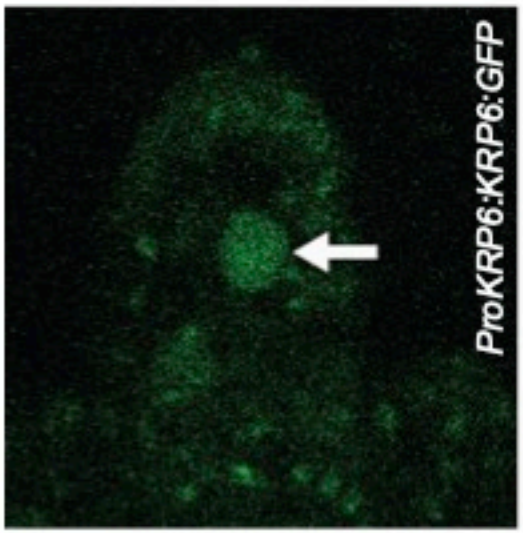

1 Select the region of interest
2 Cut the region of interest
3 Harvest the cut region for further analysis
(PCR, RT-PCR, Western Blots...)

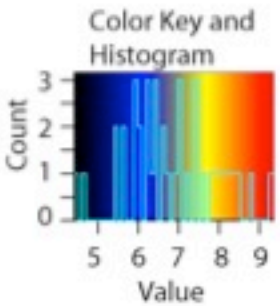
KRP6 and KRP7 are expressed in the MMCs

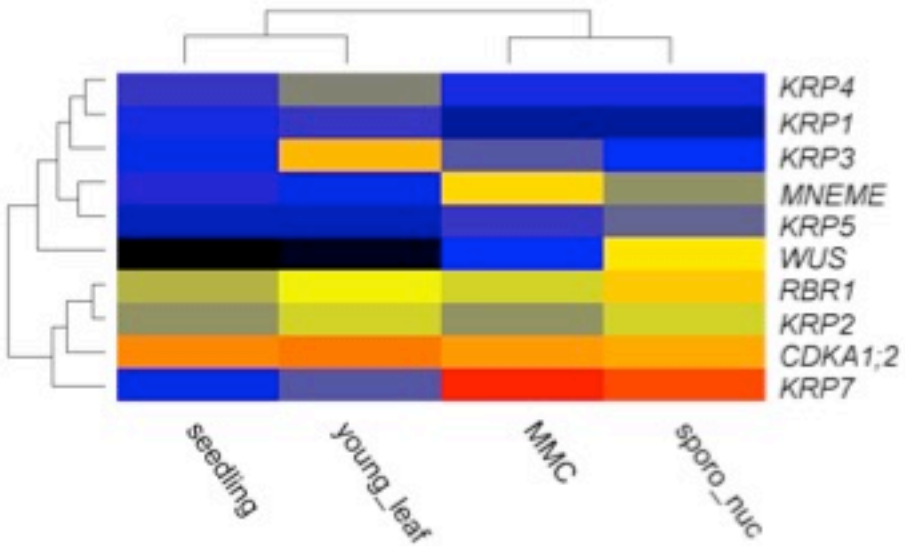
Anja Schmidt, Xin'Ai Zhao, Jonathan Bramsiepe

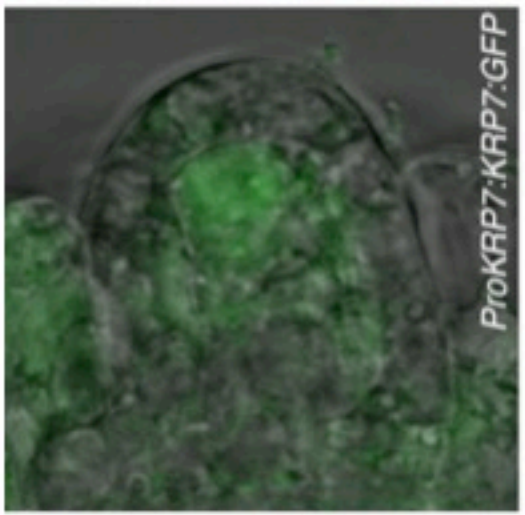






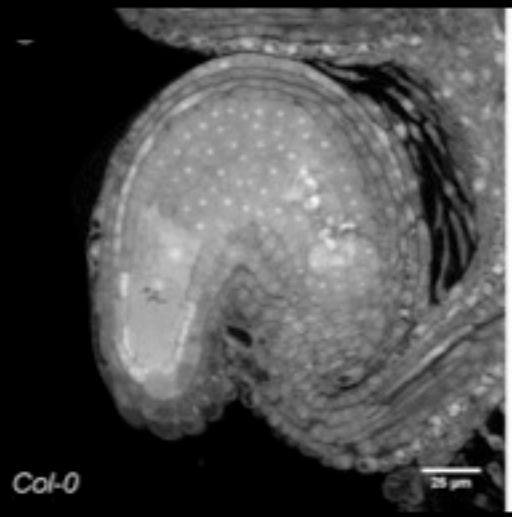


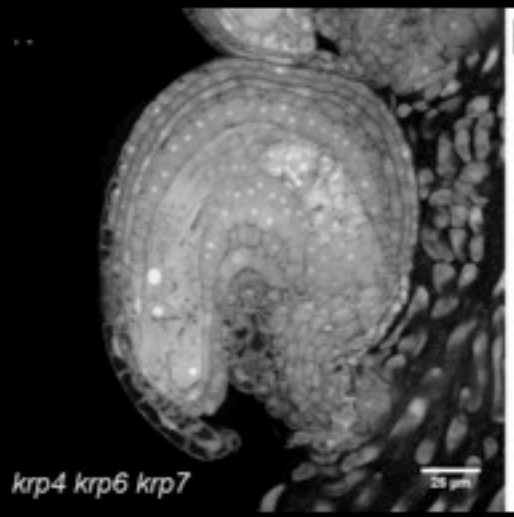


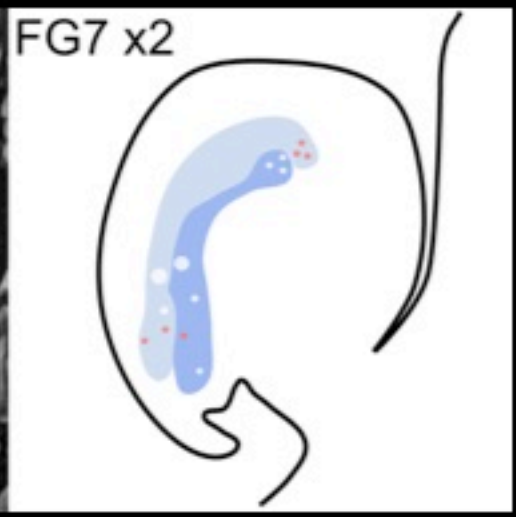


krp4 krp6 krp7 triple mutants have supernumerary gametophytes in one ovule

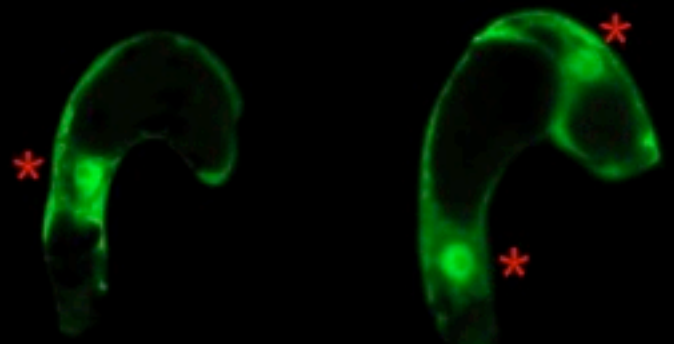
Jonathan Bramsiepe, Xin'Ai Zhao, in collaboration with Matthias Van Durme & Moritz Nowack







central cell marker DD19



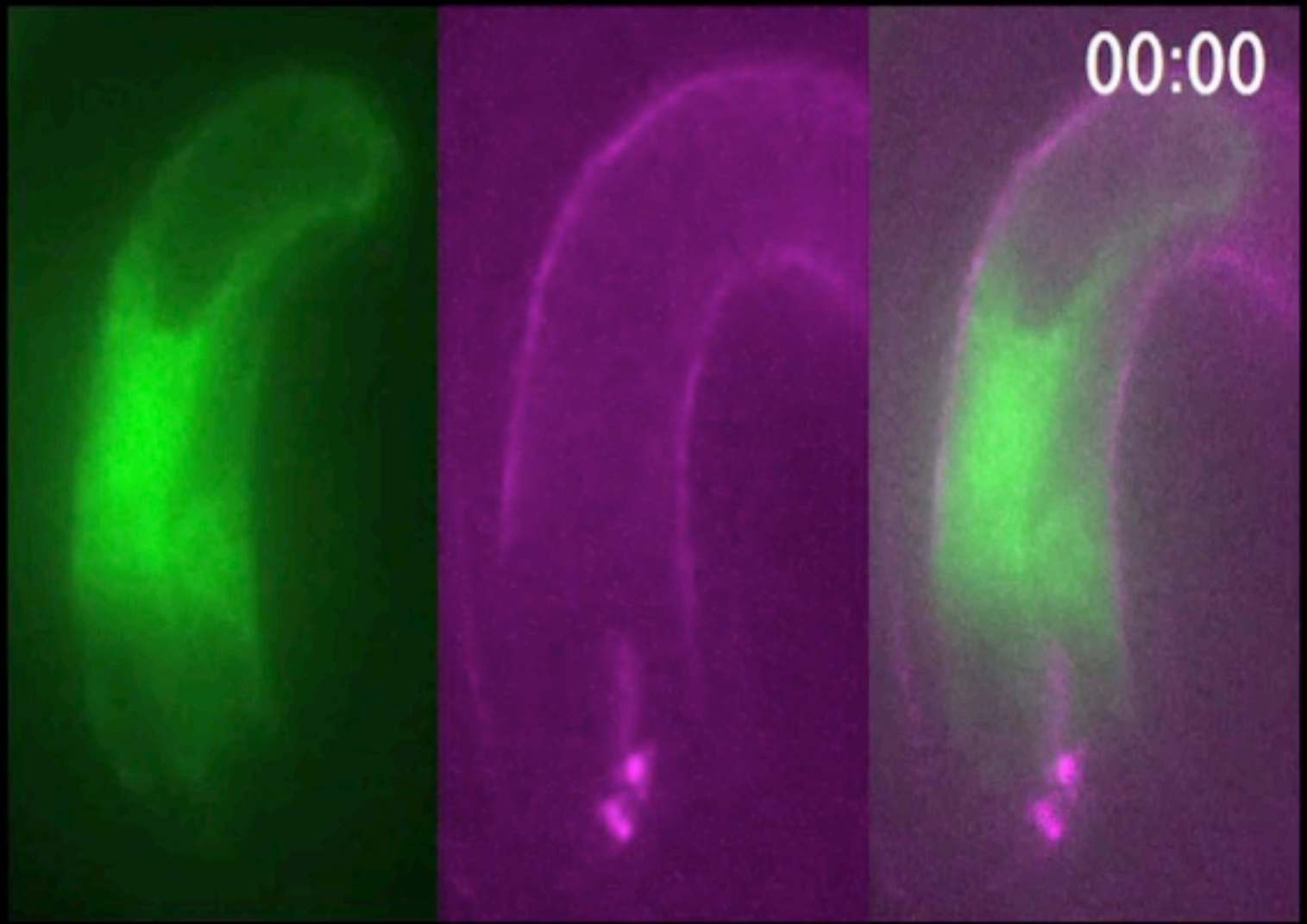
WT *krp4 krp6 krp7*

egg cell marker DD45

WT *krp4 krp6 krp7*

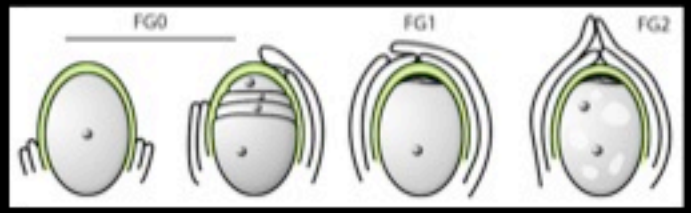
krp4 krp6 krp7 triple mutant gametophytes receive a pollen tube and can be fertilized

collaboration with Tetsuya Higashiyama & Daisuke Maruyama



Supernumary megaspore mother cells in krp 4-6-7 triple mutants

Jonathan Bramsiepe, Xin'Ai Zhao



FG0

FG0

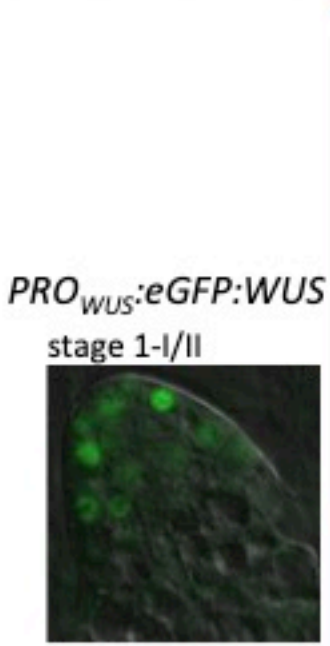
Feulgen stain

PRO_{KNU}:GFP:nls

Wildtype

krp 4-6-7

Emerging pathways of germ line entry



develop. input

- NZZ/SPL (+
- Cytokinin (+)
- BEL1 (-)
- CNA-PHAB-PHV (-)

WUS

- WIH 1&2 (+)
- TRN1&2 (+)
- MEM (-) ?

MMC differentiation

Meiosis

ovule development program

MMC development program

?

KRP

CDKA;1

RBR

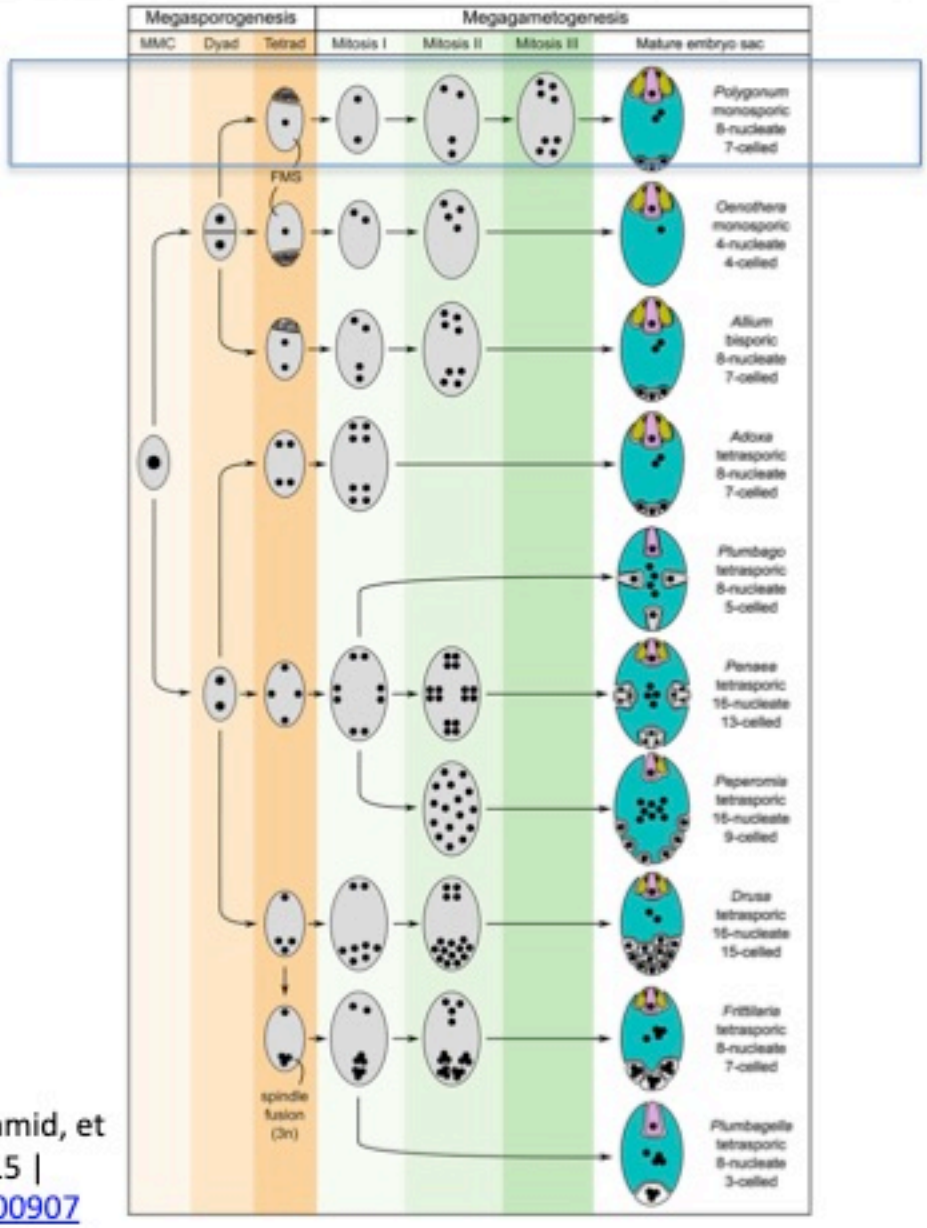
WUS

cell prolif via FBL17

?

Embryosack-Typen

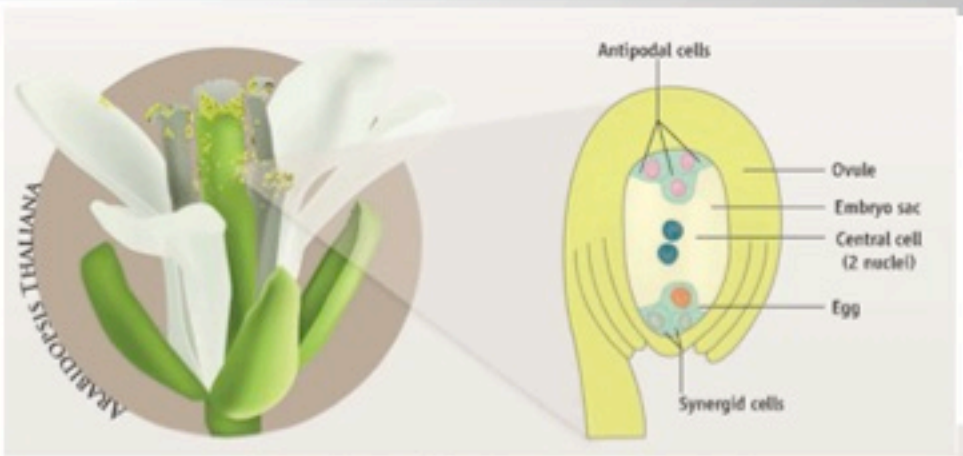
Panchanan Maheswari
(9. November 1904 – 18. Mai 1966)



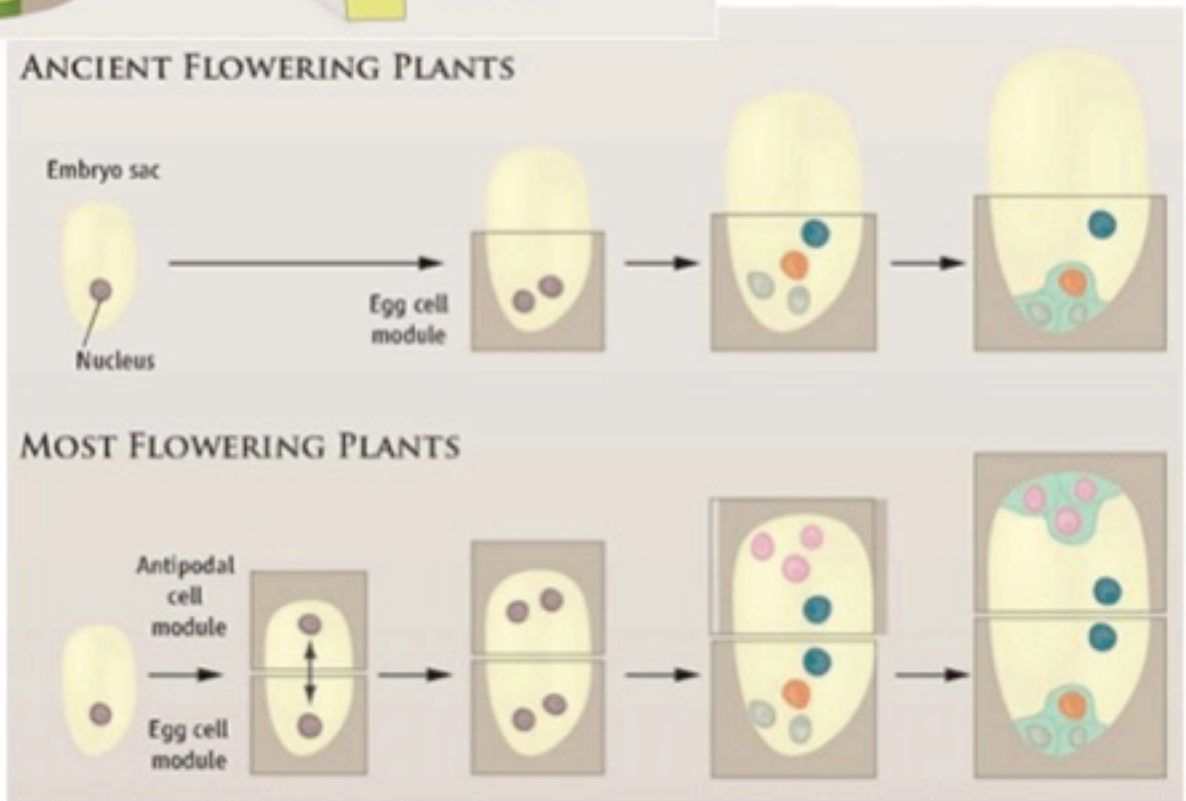
Polygonum-Typ
am weitestens verbreitet, dazu auch Arabidopsis, Mais, Reis

entnommen und modifiziert nach Schmid, et al. Front. Plant Sci., 03 November 2015 | http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00907

Evolution und Entwicklung: Der Embryosack – eine modulare Struktur?



***Hypothese*:**
triploides Endosperm hat einen Mehrwert



ursprüngliche Blütenpflanzen:
4 zelliger, 4-nucleärer Embryosack

moderne Blütenpflanzen:
7-zelliger, 8-nucleärer Embryosack

Friedman : Science 26 June 2009: Vol. 324 no. 5935 pp. 1652-1653

Zwei zentrale Fragen

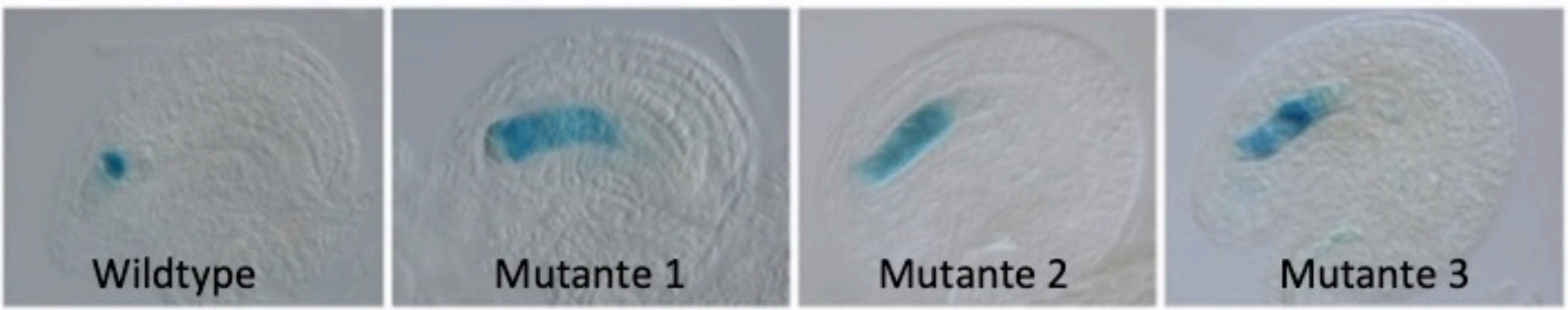
1. Wie wird die Meiozyte (Megasporenmutterzelle) spezifiziert?

2. **Wie werden die verschiedenen Zellen des Embryosacks spezifiziert?**

Zellspezifizierung im Embryosack

Vorgehen: Mutagenese und Suche nach Mutanten, in denen die Spezifizierung gestört ist

Alle wollen Eizelle werden...

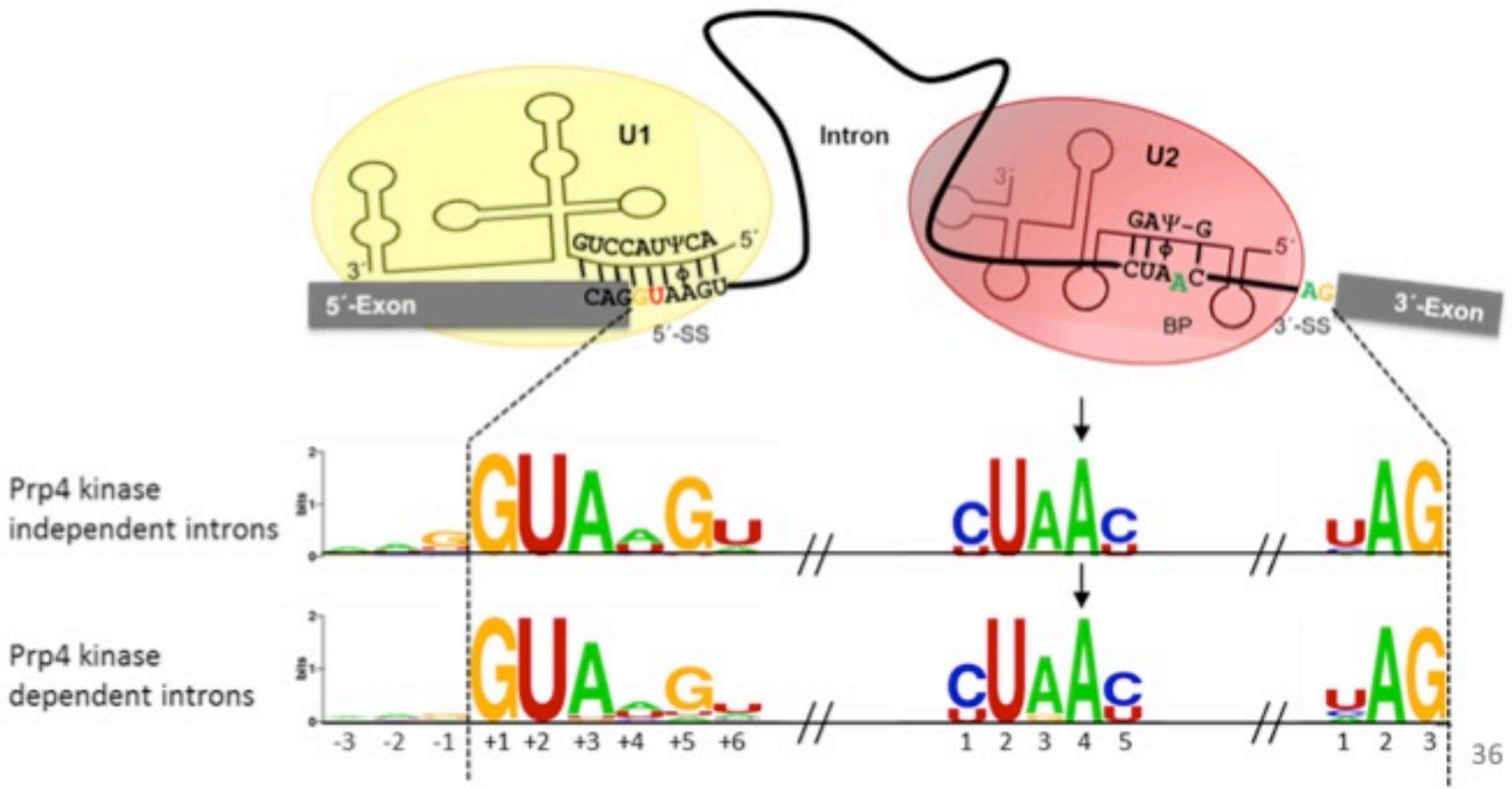


Hypothese: Hierarchie im Embryosack:

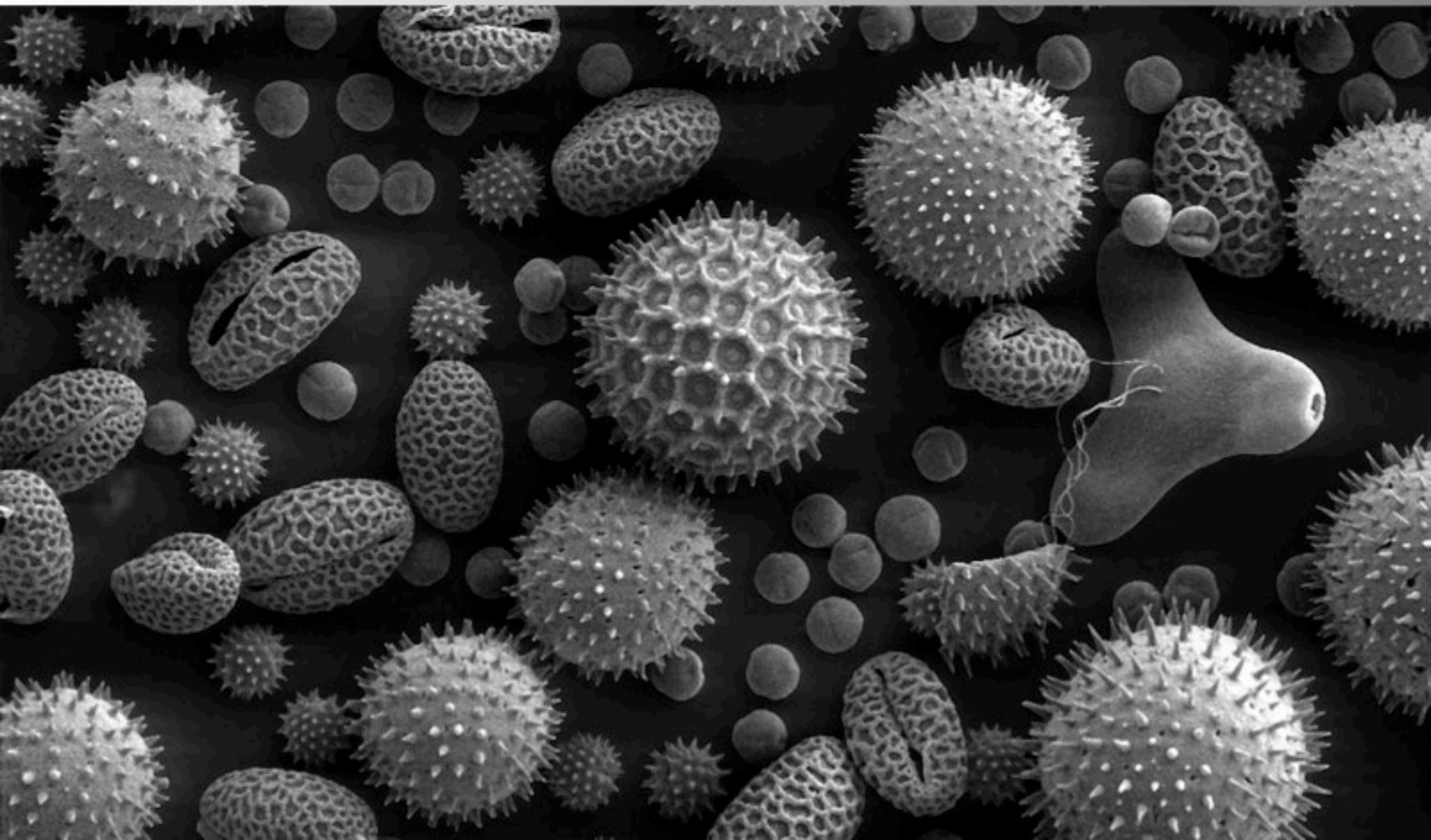
Nach: Groß-Hardt R, et al. PLoS Biol 5(3): e47. doi:10.1371/journal.pbio.0050047

Hinweis auf Posttranskriptionelle Regulation?

Gen 1 (LACHESIS (LIS)) kodiert für eine PPR4-ähnliche Kinase,
die anderen Gene (2-3) kodieren für weitere Faktoren der Splicemaschinerie

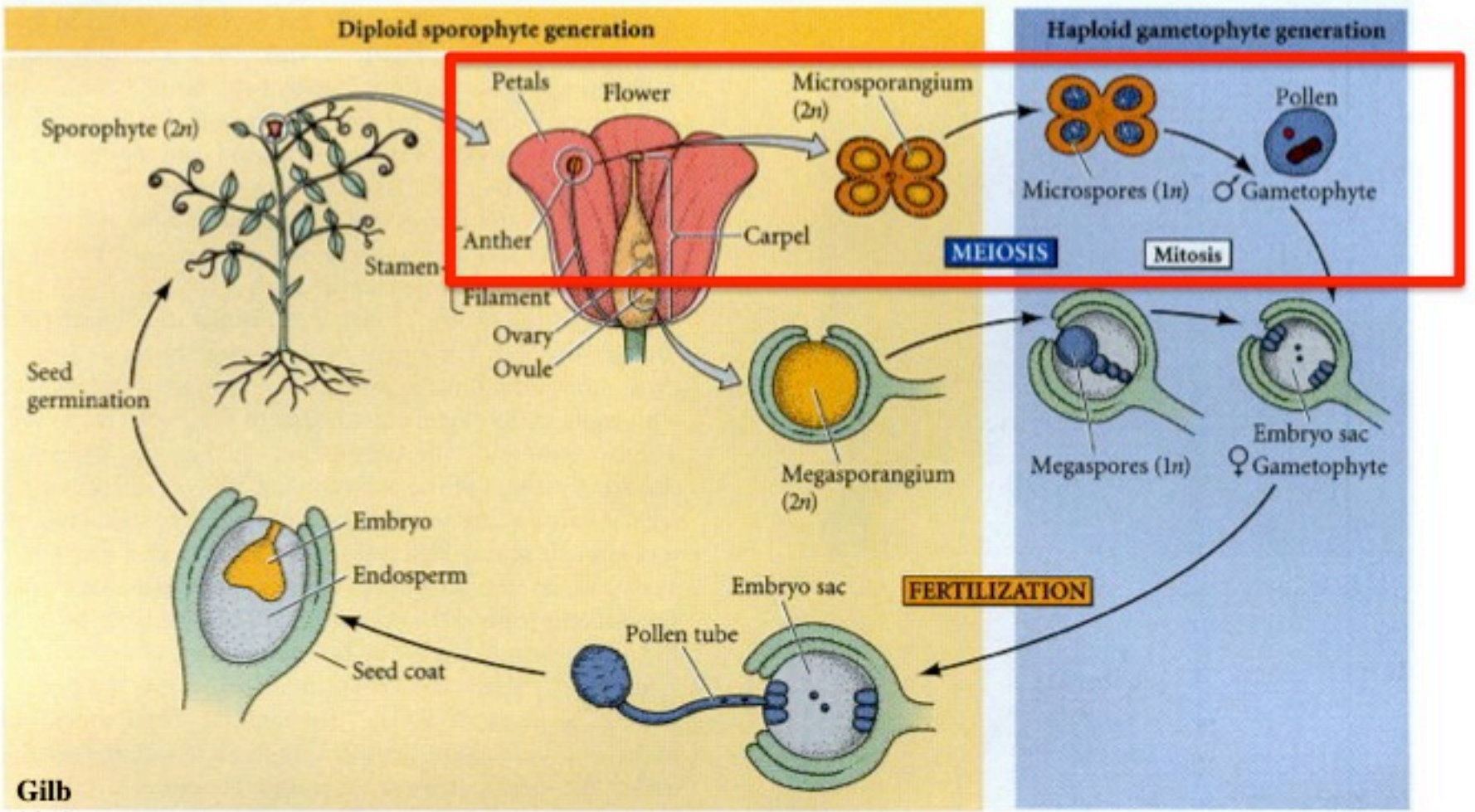


Entwicklung des männlichen Gametophyten



Entwicklung des männlichen Gametophyten

Mikrosporogenese **Mikrogametogenese**



Gilb
20-4

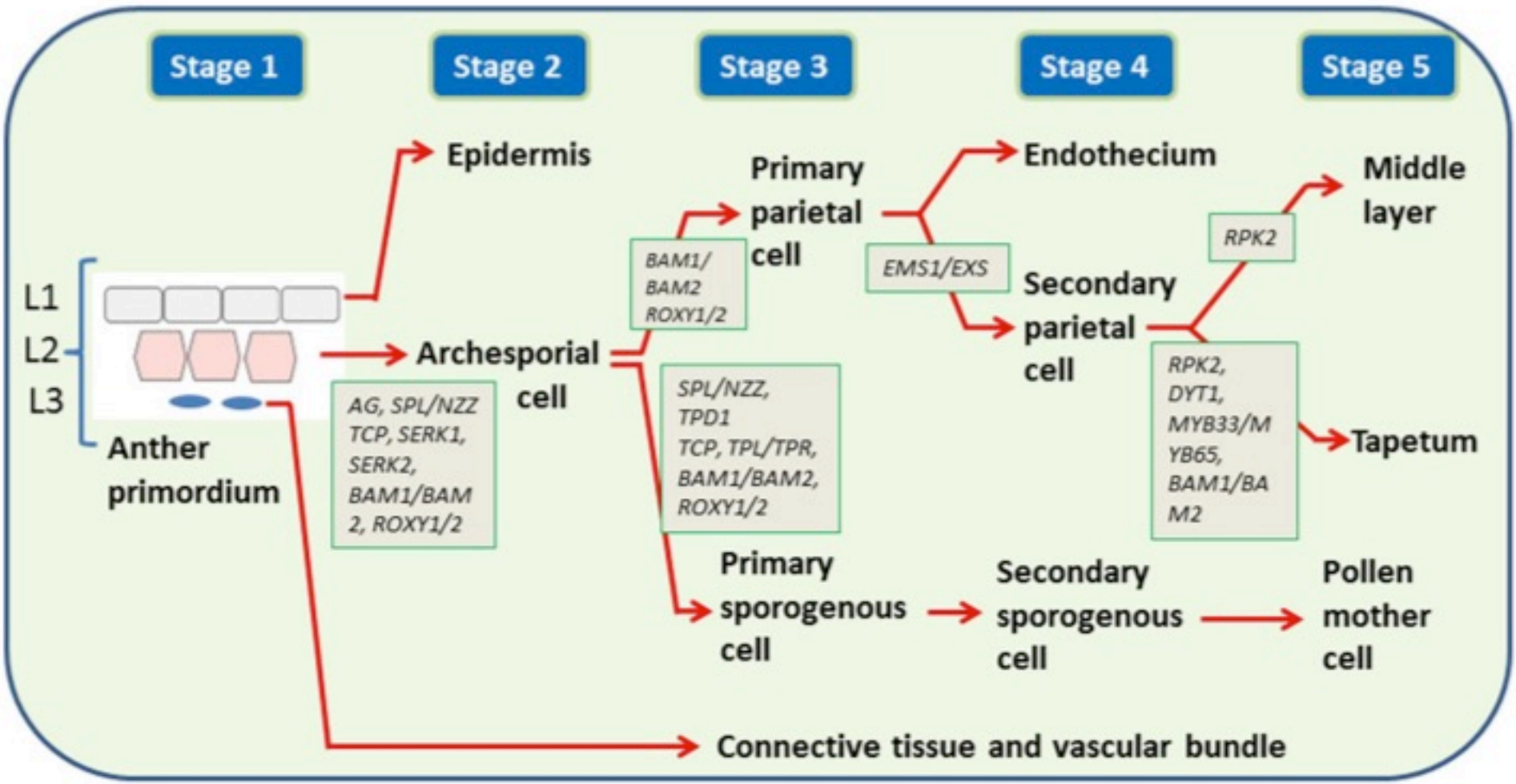
Zentrale Fragen

1. Wie wird die Meiozyte (Mikroasporenmutterzelle) spezifiziert?

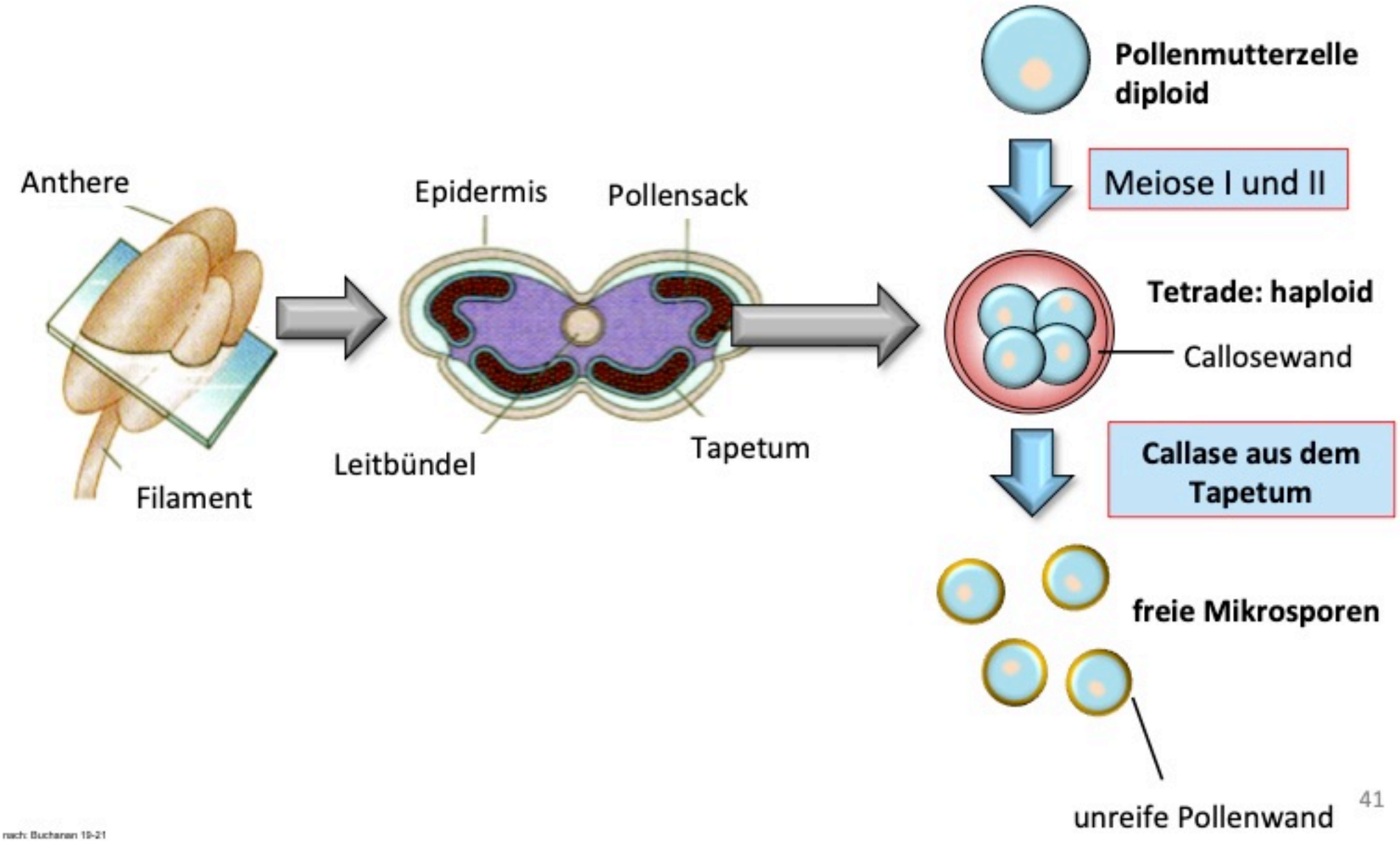
2. Wie werden die verschiedenen Zellen des Pollen gebildet?

3. Wie findet der Pollen seinen Weg zum Embryosack? ➔ nächstes Kapitell

Mikrosporogenese

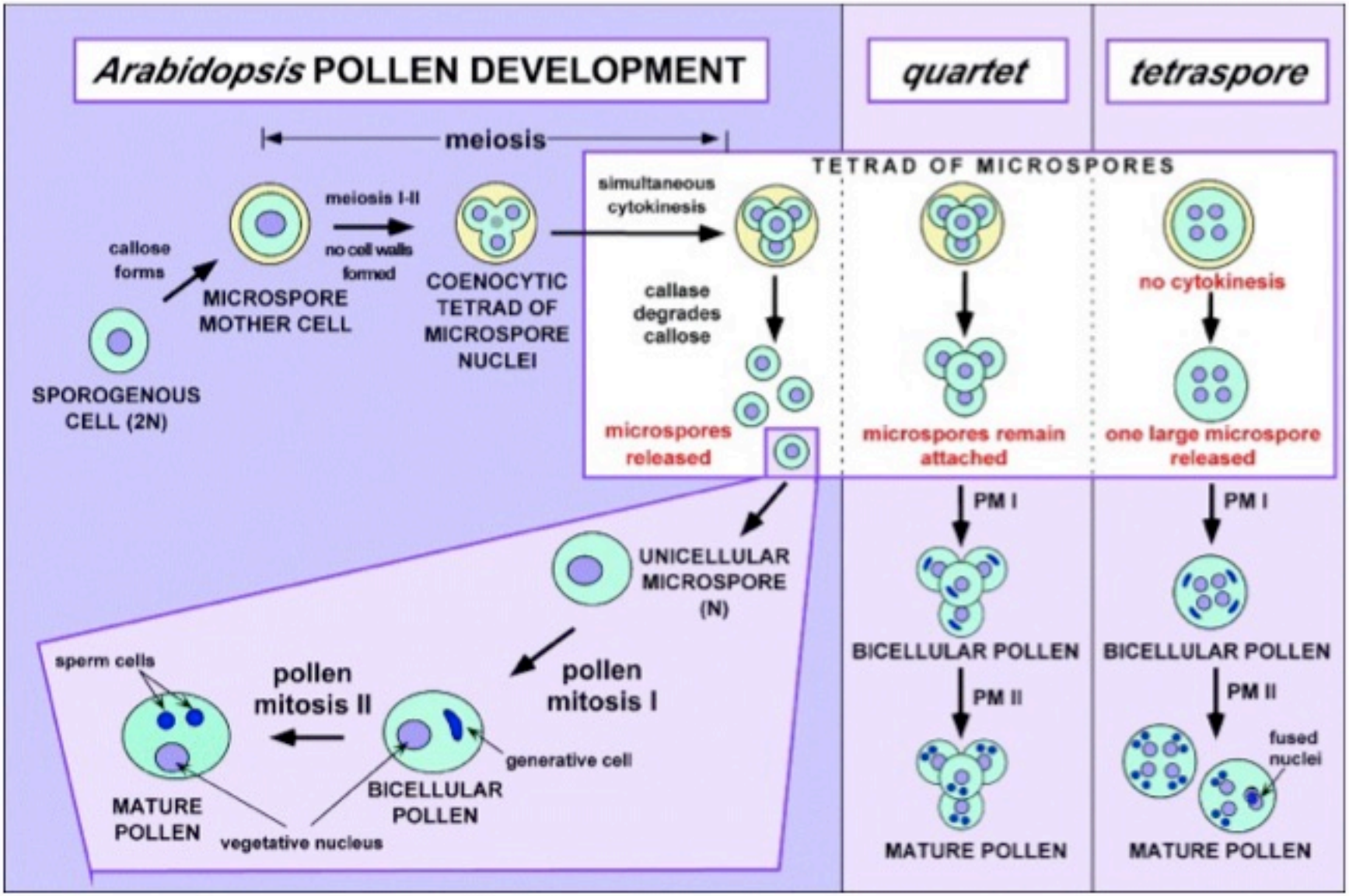


Entlassen der Mikrospore



nach: Buchanan 19-21

Zytokinese Mutanten



Tetradenanalyse

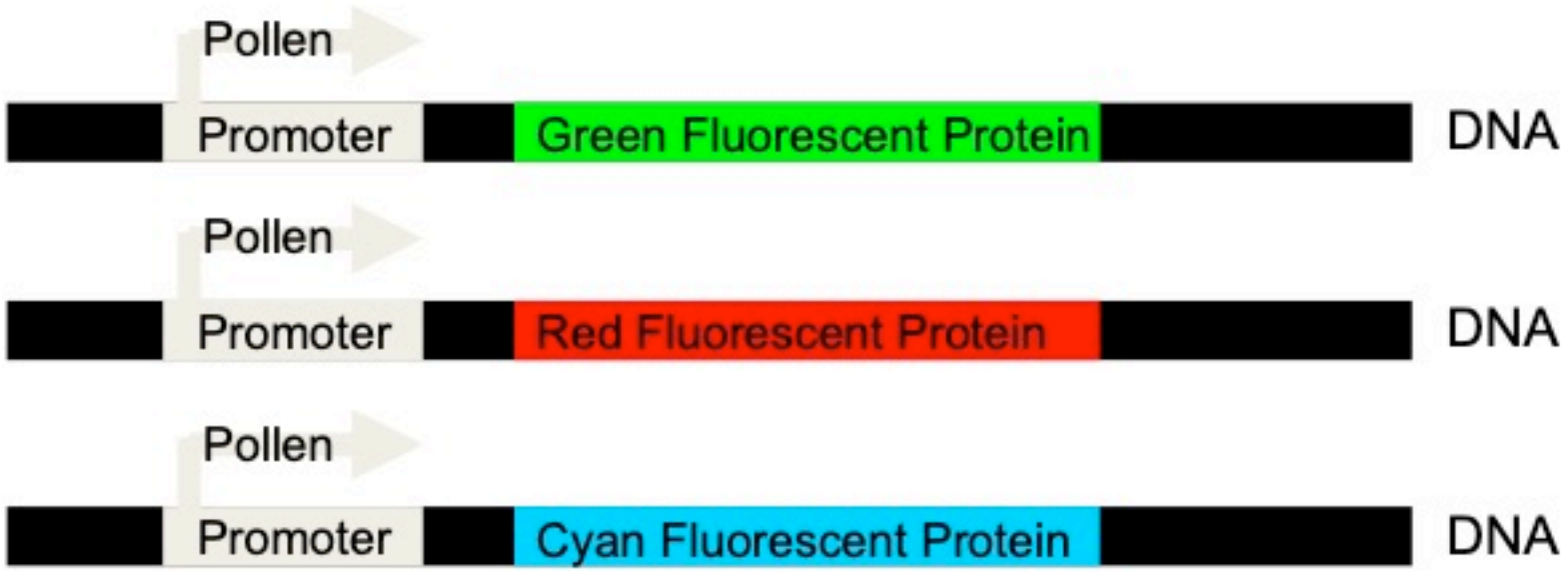
quartet

Berchowitz LE, **Copenhaver** GP. Nat Protoc. 2008;3(1):41-50. doi: 10.1038/nprot.2007.491.

Zwei Bestandteile:

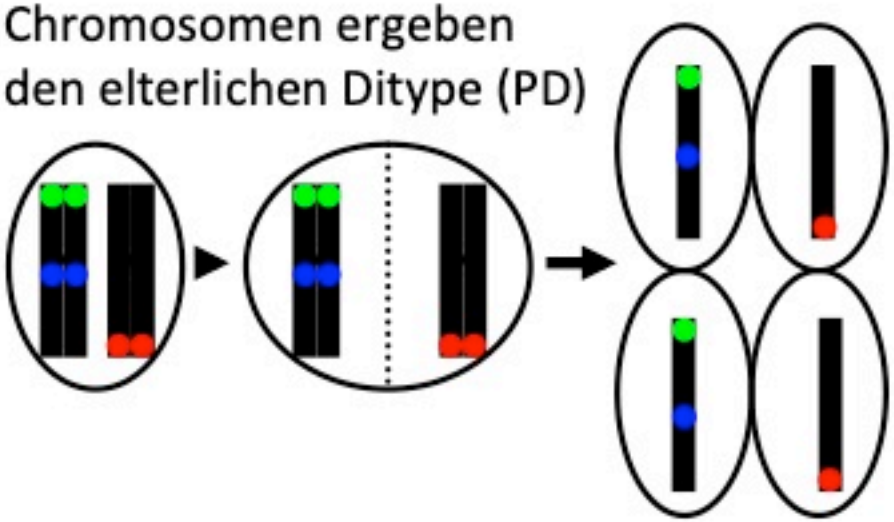
1. ***quartet* Mutant**

2. **FTL lines** (Fluorescently-tagged lines)



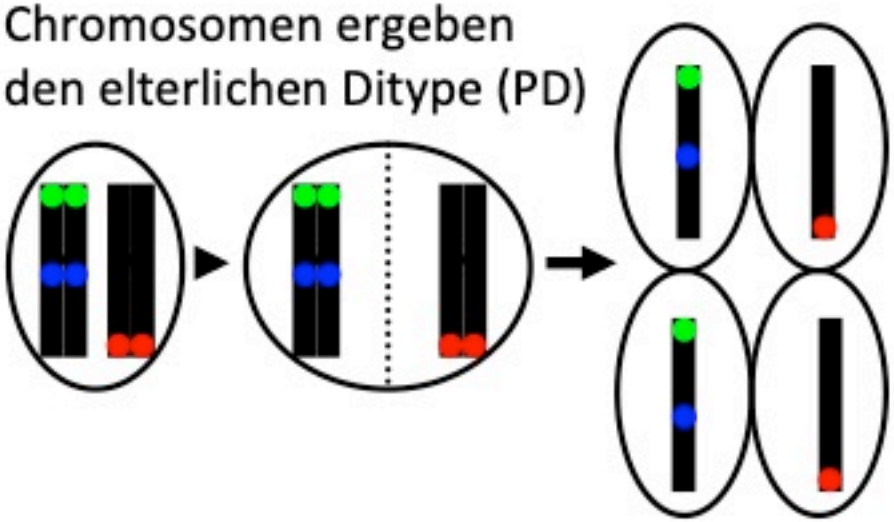
Das FTL-System *at work*

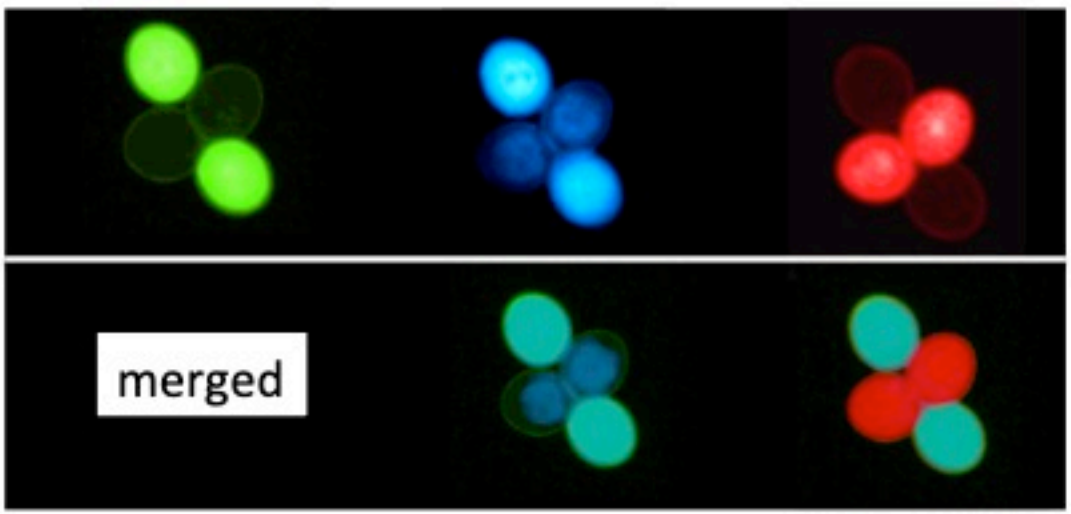
Nicht-rekombinante Chromosomen ergeben den elterlichen Ditype (PD)



Das FTL-System *at work*

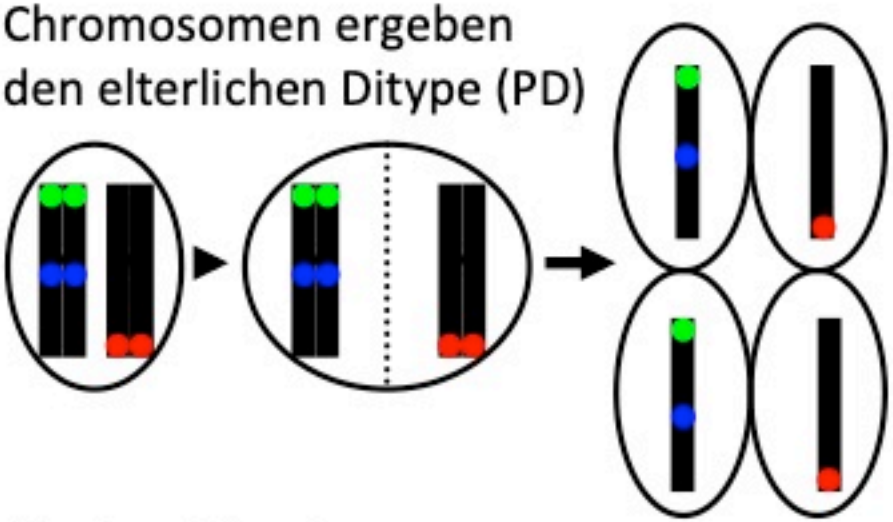
Nicht-rekombinante Chromosomen ergeben den elterlichen Ditype (PD)

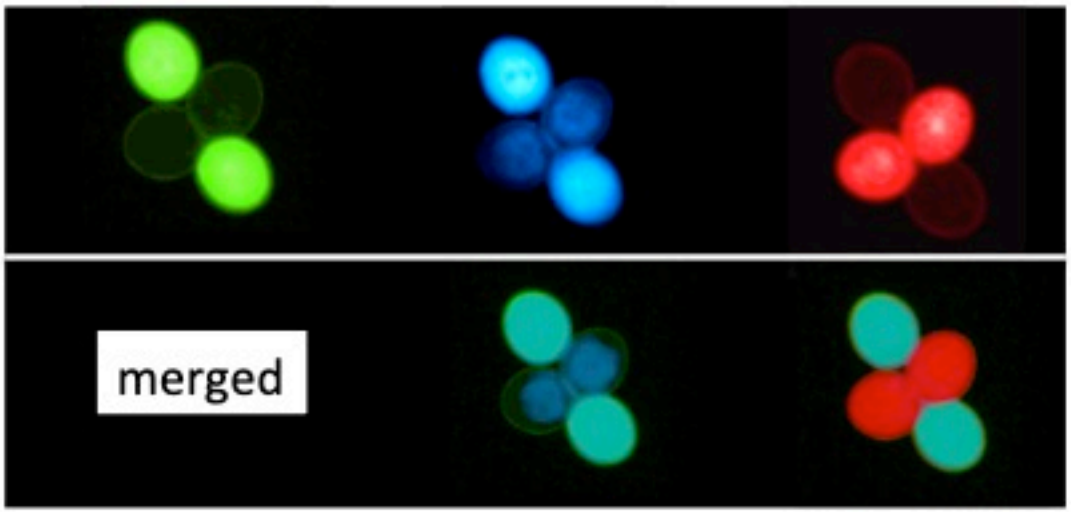




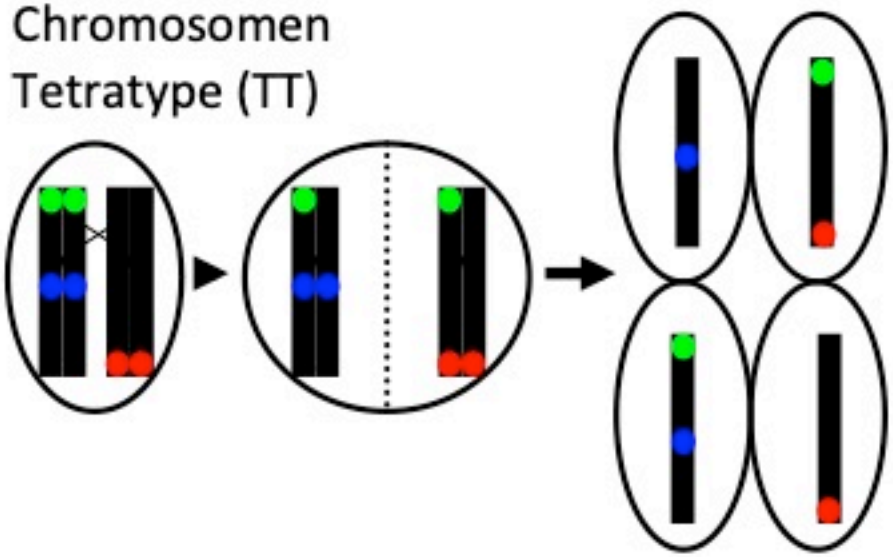
Das FTL-System *at work*

Nicht-rekombinante Chromosomen ergeben den elterlichen Ditype (PD)



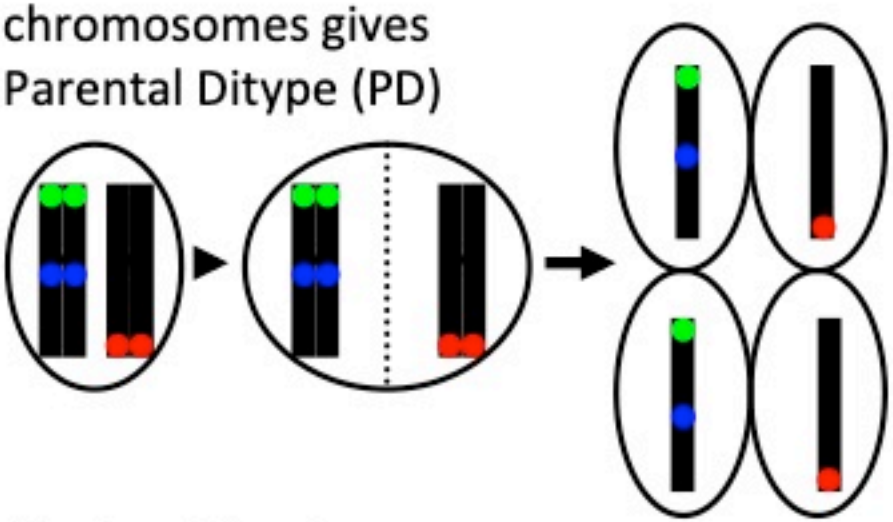


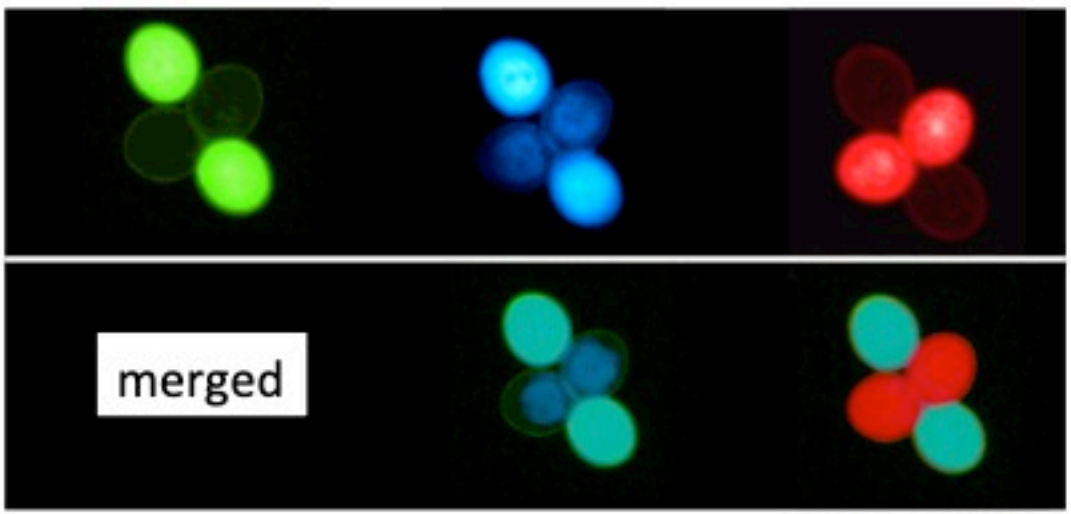
2 rekombinante Chromosomen Tetratype (TT)



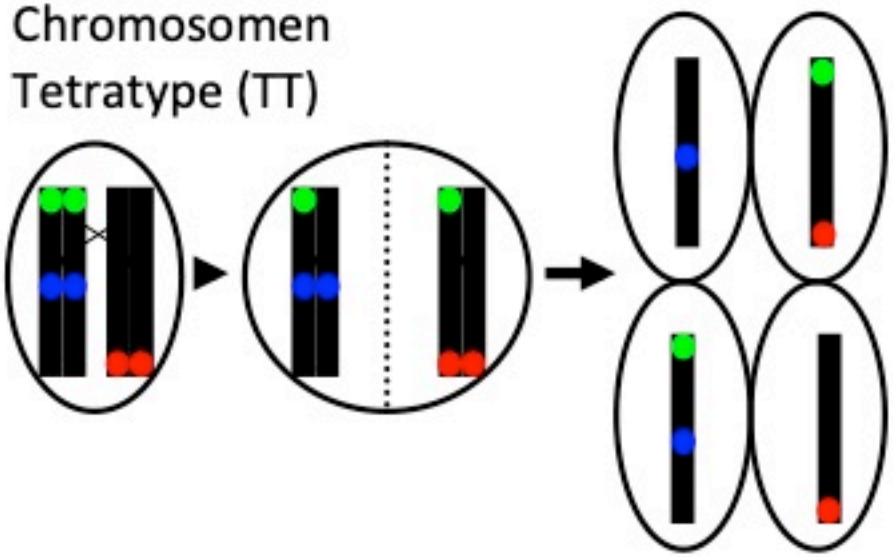
Das FTL-System *at work*

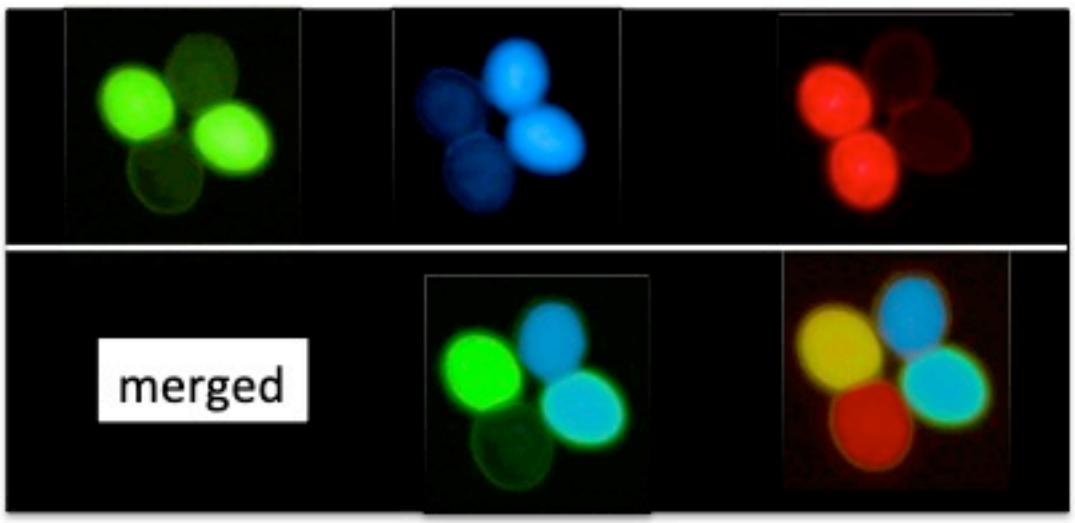
non-recombinant chromosomes gives Parental Ditype (PD)





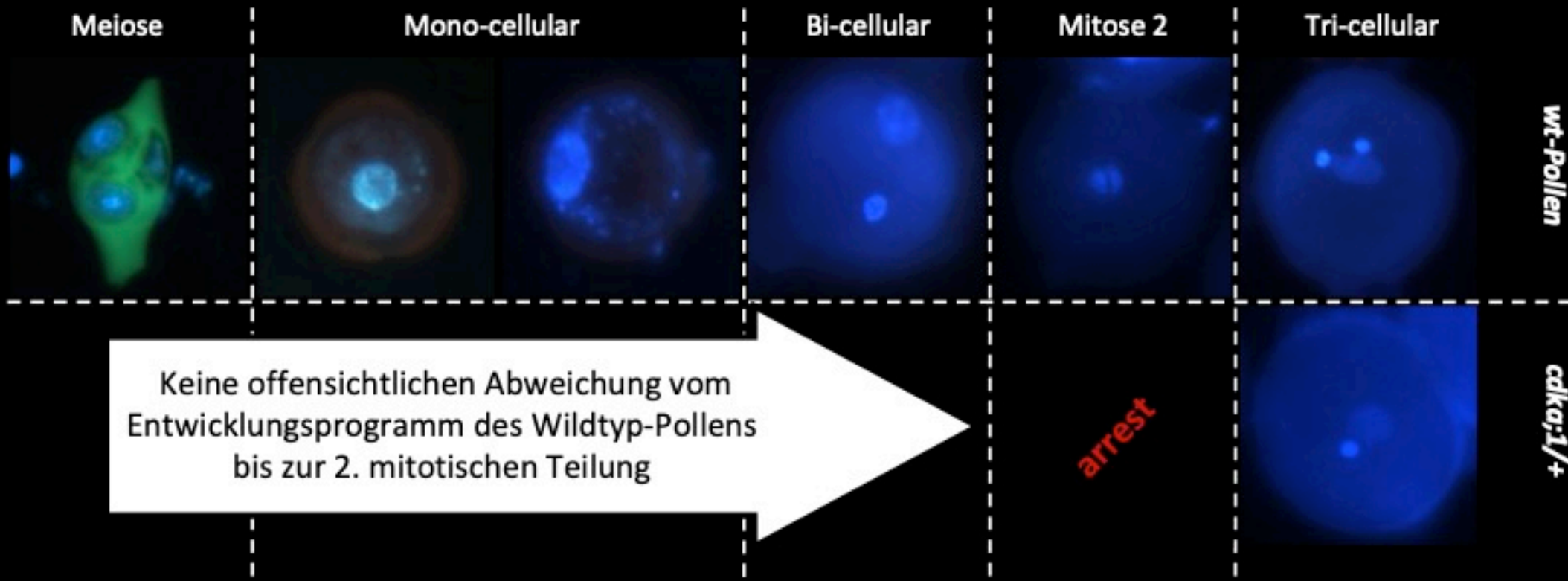
2 rekombinante Chromosomen Tetratype (TT)





Mutationen in *CDKA;1* führen zu einem Zellteilungsstop nach PMI

Nowack et al. 2006. Nature Genetics, 38, 63-7.

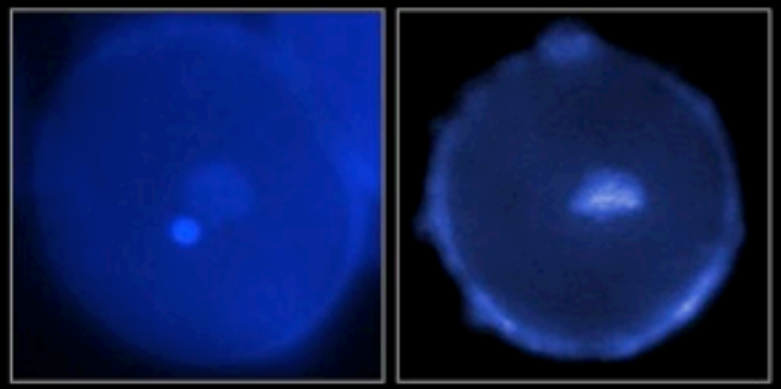


Genetische Zerlegung der Pollenzellteilung

Nowack et al. 2006. Nature Genetics, 38, 63-7., Gusti, Baumgartner, Nowack et al. 2009. PLoS ONE 4., Zhao et al. 2012. PLoS Genetics 8:e1002847. unpublished data

Type I mutant pollen, e.g. *cdka;1*, *fbl17*

with 1/0 sperm cells and
1 vegetative cell



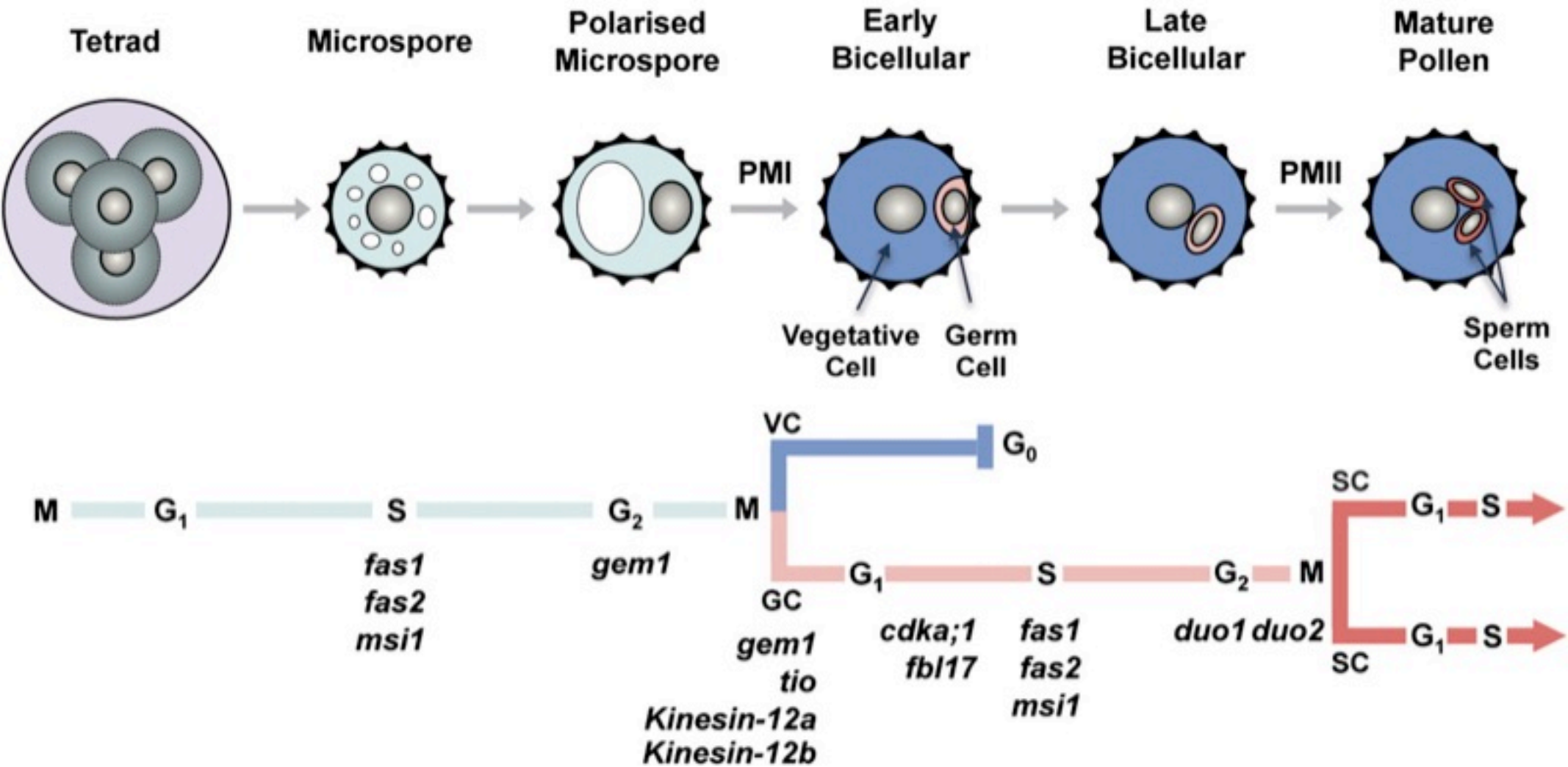
Wildtype pollen

mit 2 Spermazellen und
1 vegetativen Zelle

Type II mutant pollen, e.g. *rbr1*, *krp*

with >2 sperm cells and/or
>1 vegetative cell

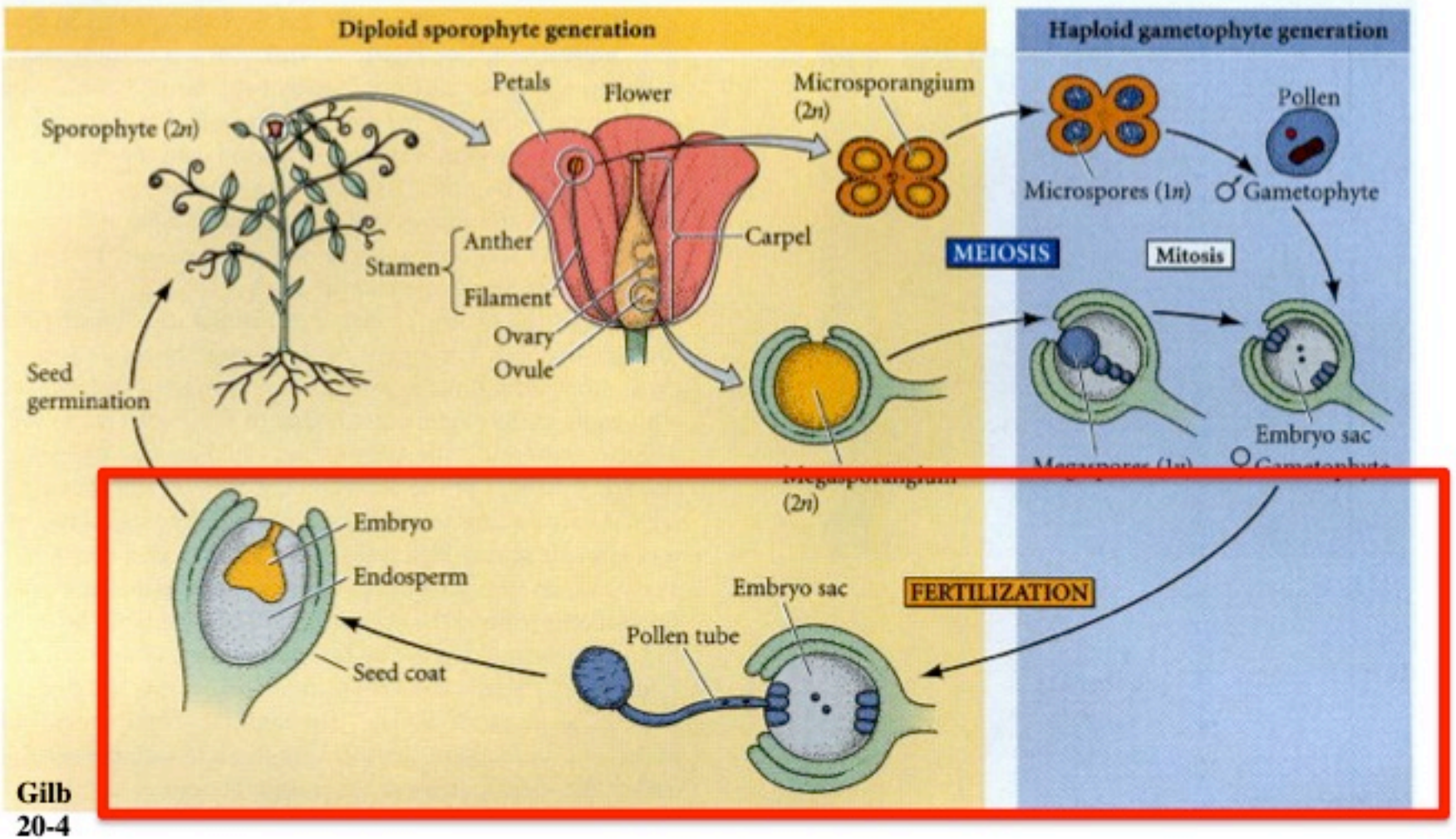
Model der Zellteilung während der männlichen Gametogenese



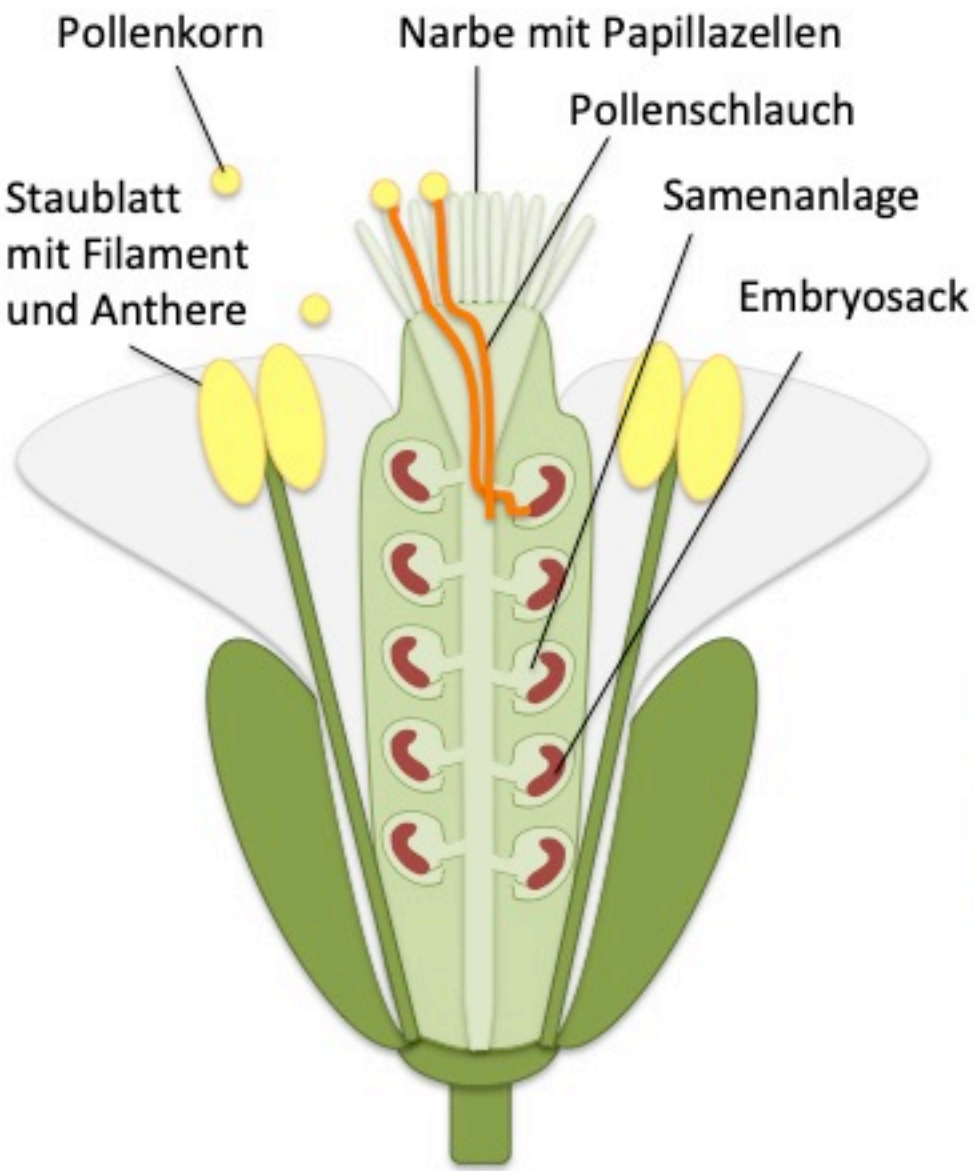
Grundlagen und Konzepte

- Lebenszyklus der Pflanze
- Entwicklung des weiblichen Gametophyten
- Entwicklung des männlichen Gametophyten
- **Bestäubung und Befruchtung**

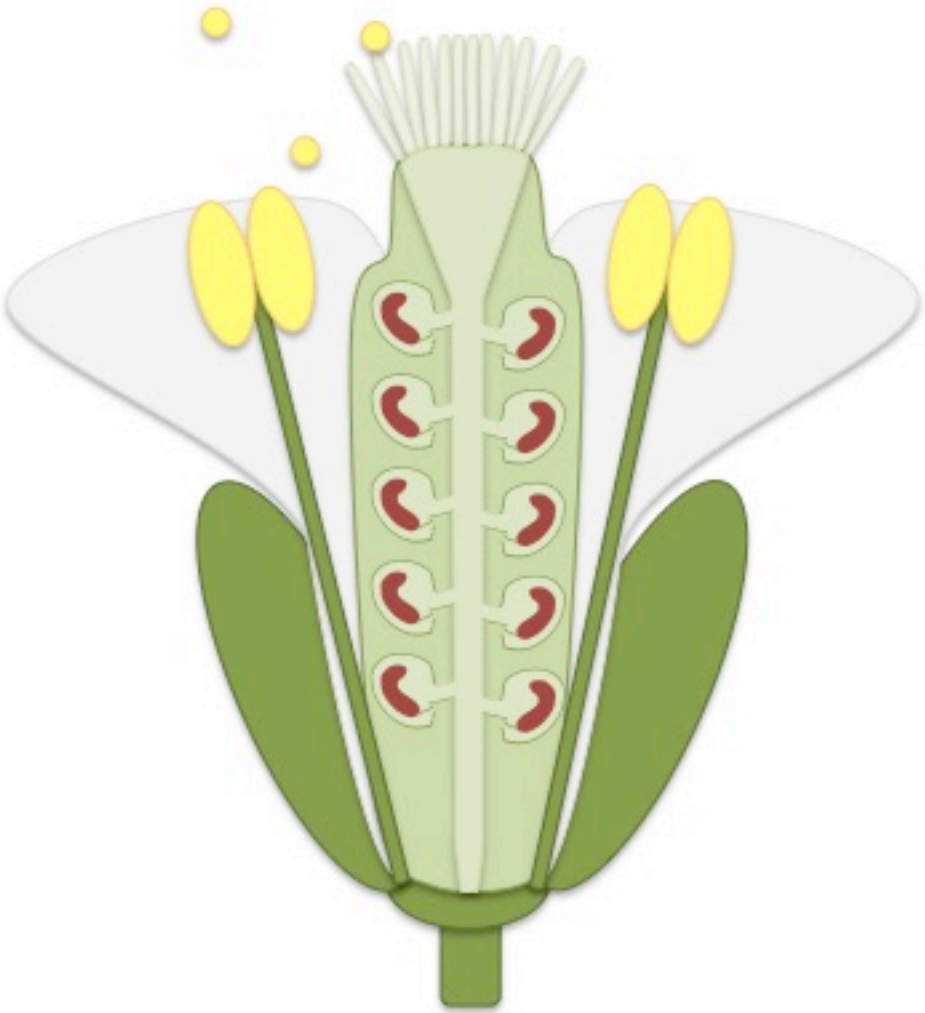
Bestäubung und Befruchtung



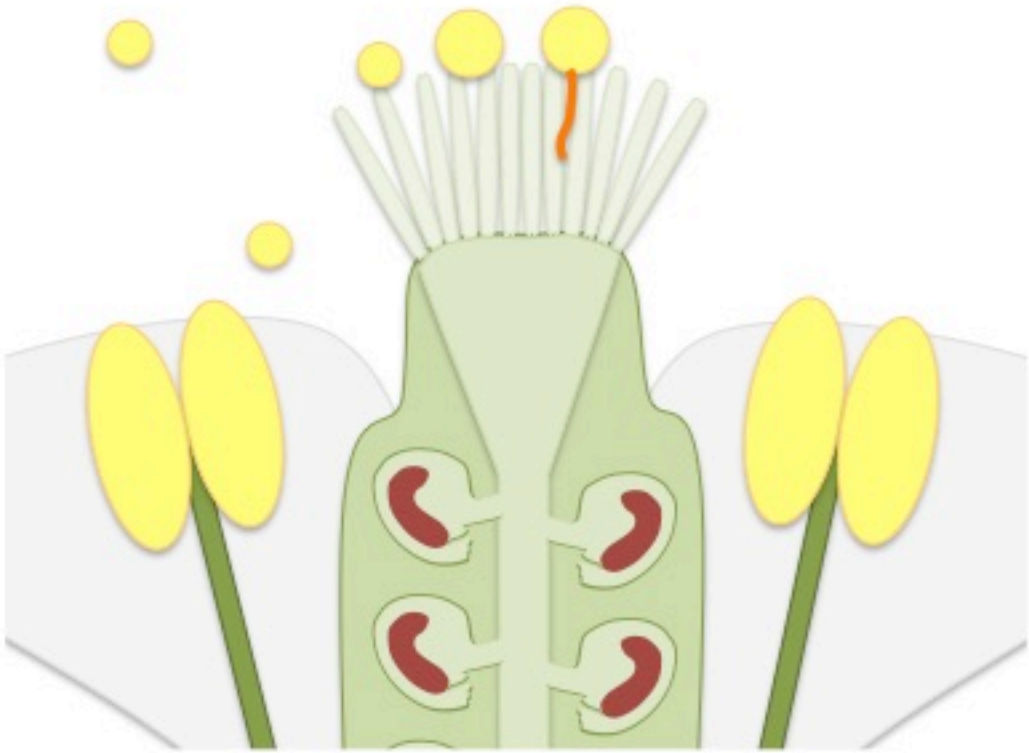
Wie kommen die Spermazellen im Pollen zu den Eizellen der Samenanlagen?

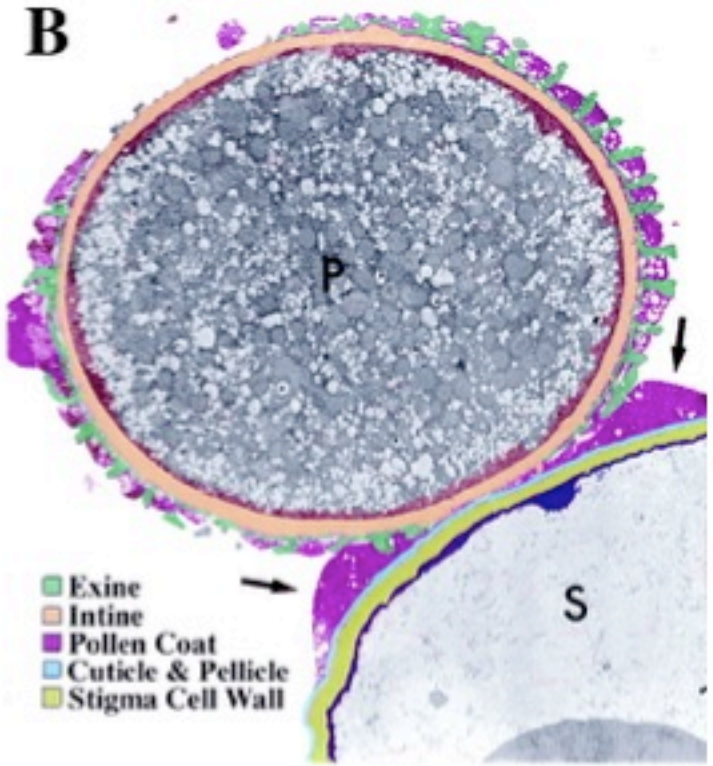


Pollinierung



Pollinierung und Keimung



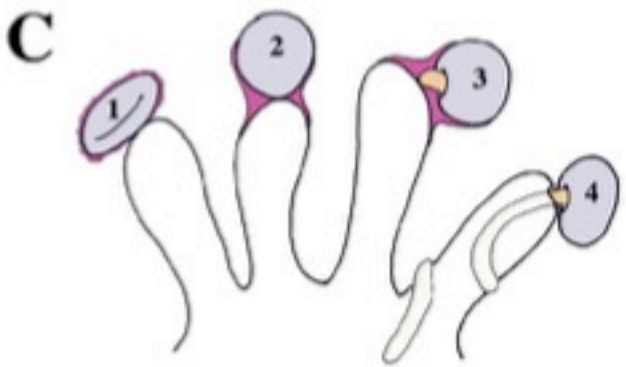


1 Anheftung und Kontaktbildung

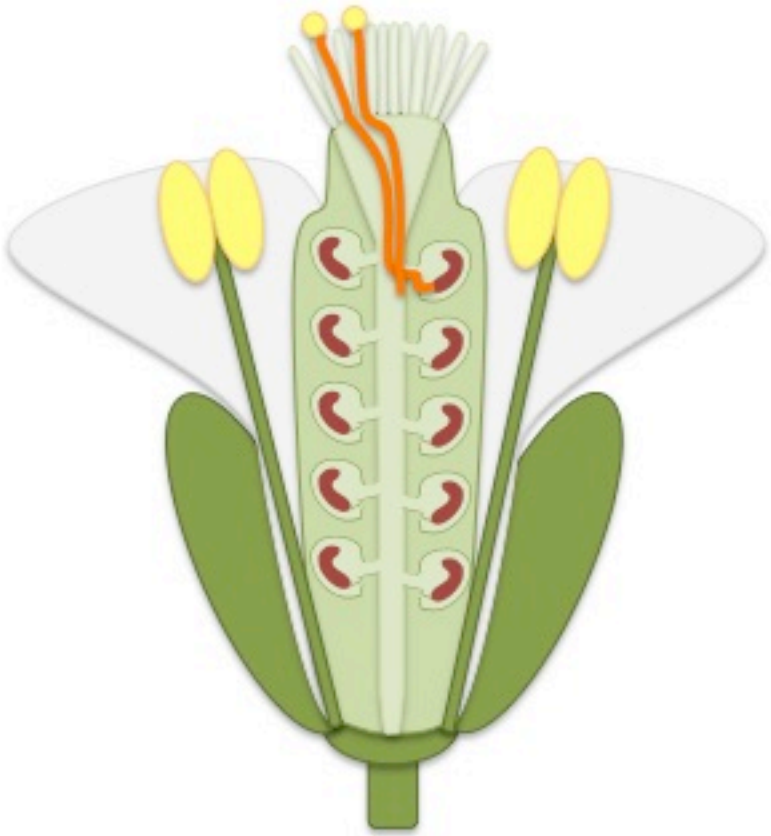
2 Hydratation

3 Austritt des Pollenschlauchs

4 Pollenschlauchwachstum und Eindringen in die Papillazellwand

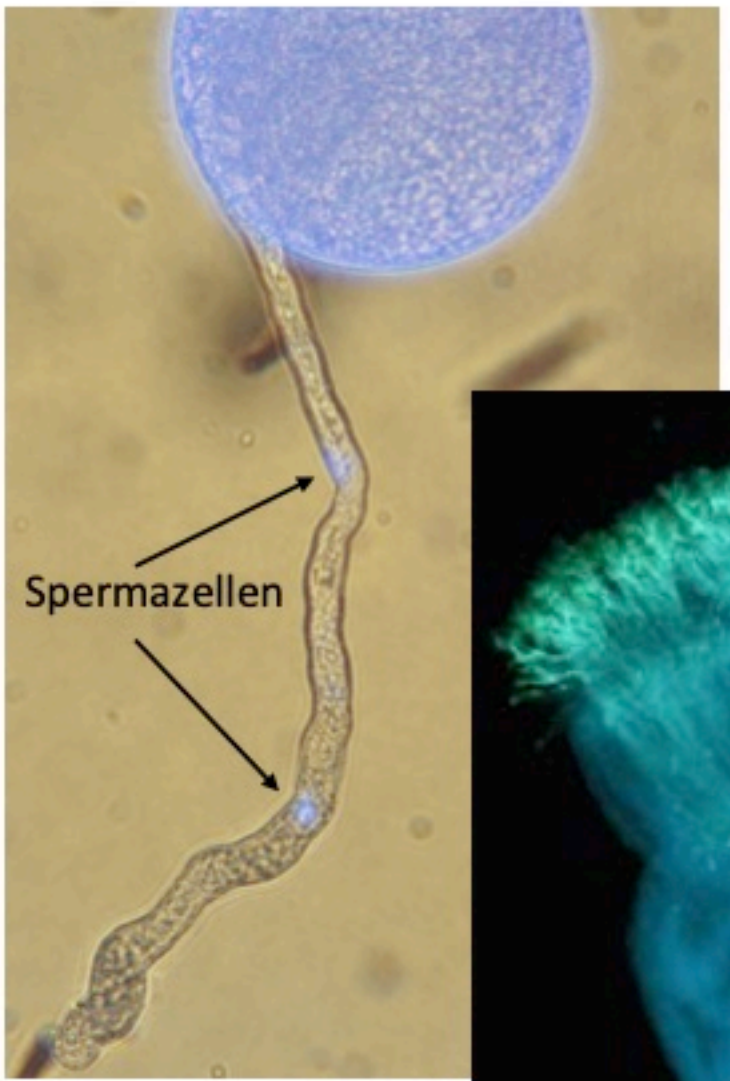


Wachstum des Pollenschlauches

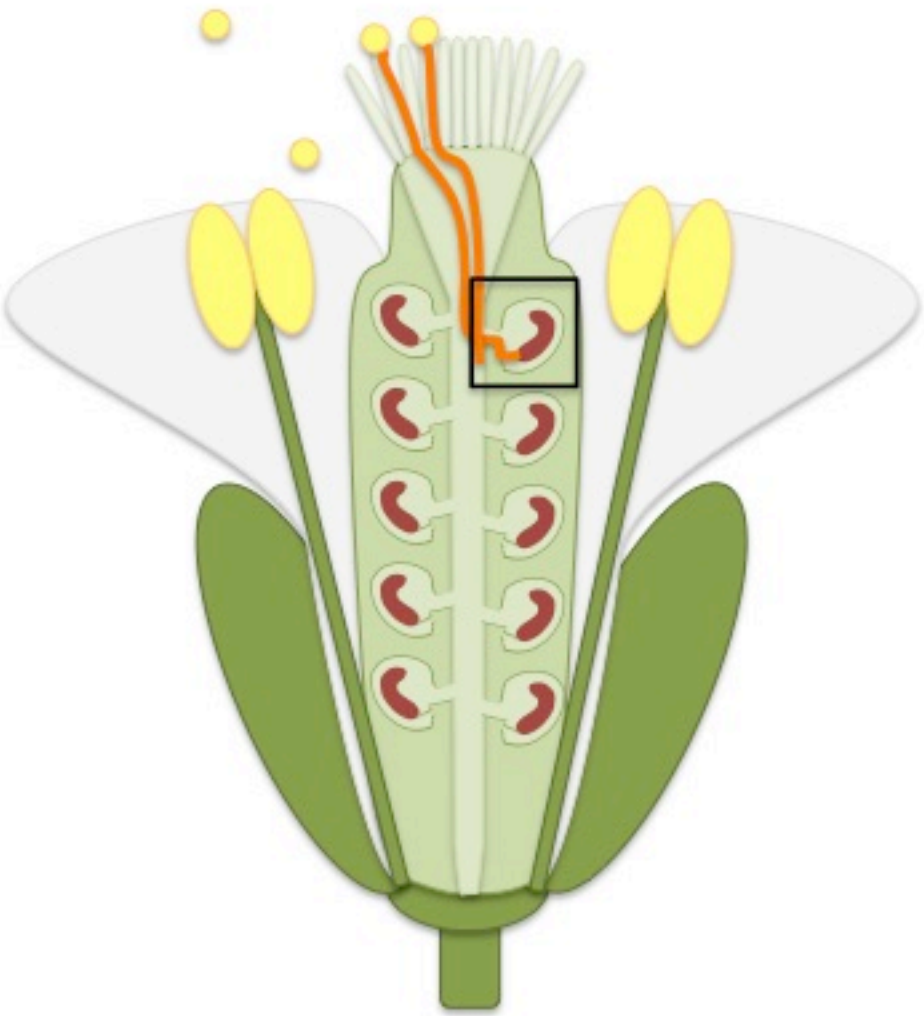


Bis zu 1 cm/Stunde (z.B. Mais)

Bis zu 50 cm lang



Etappen der Pollenschlauchanlockung



1. **Sporophytische Kontrolle der Keimung**, bei inkompatiblen Arten keimt der Pollen nicht aus (Wechselwirkung zwischen Pollen und Papillazellen)

2. **Sporophytisches Leiten** des Pollenschlauchwachstums in den Papillazellen, im Transmissionsgewebe

3. **Sporophytisches Anlocken** zur Samenanlage (Funikuläre Anlockung)

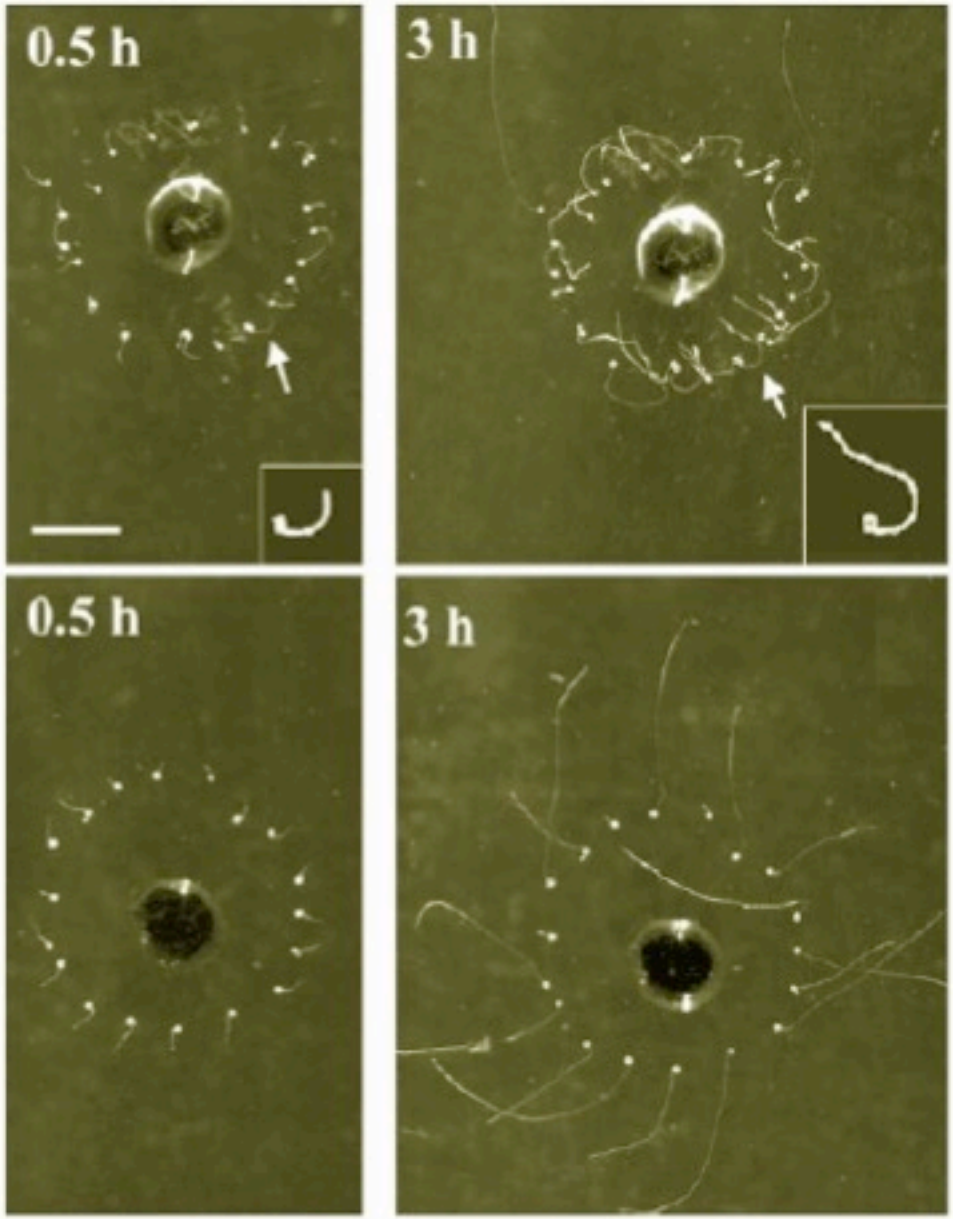
Chemische Lockstoffe

Die Wegfindung beim Pollenschlauchwachstum ähnelt der Wegfindung beim Neuronenwachstum und folgt entlang chemischer Gradienten.

Stigma Proteine (Chemocyanin, SCA)

SCA= stigma/style cysteine-rich

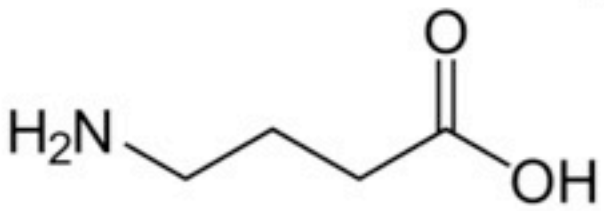
Kontrolle:



Kim 2003

GABA

γ-Aminobuttersäure: GABA
ist eine Komponente der
sporophytischen
Pollenschlauchanlockung



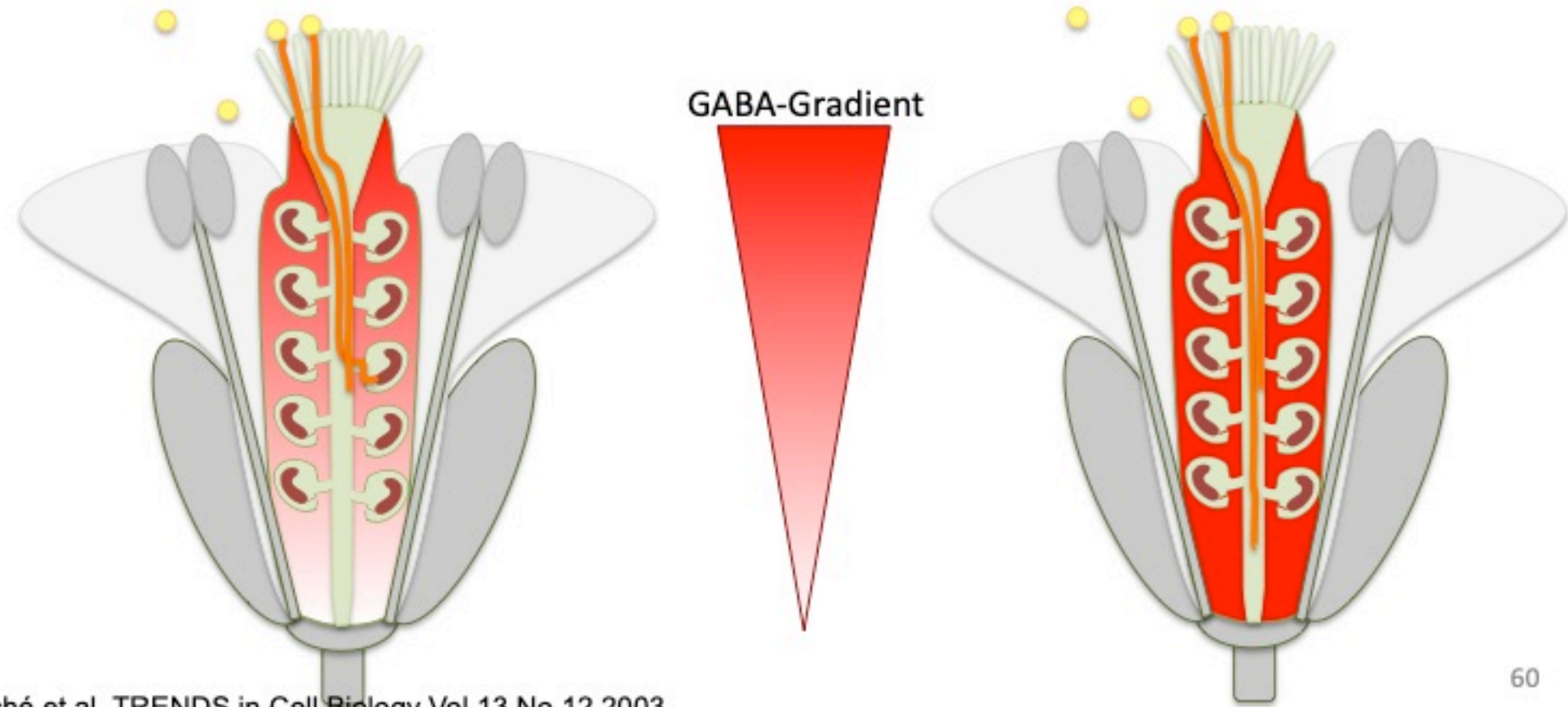
nicht-proteinogene Aminosäure
Derivat der Glutaminsäure

(bei Tieren: wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im Zentralnervensystem, auch für Neuronenteilung und –differenzierung)

GABA-Perzeptionsmutante

pop2: pollen-pistil incompatibility 2

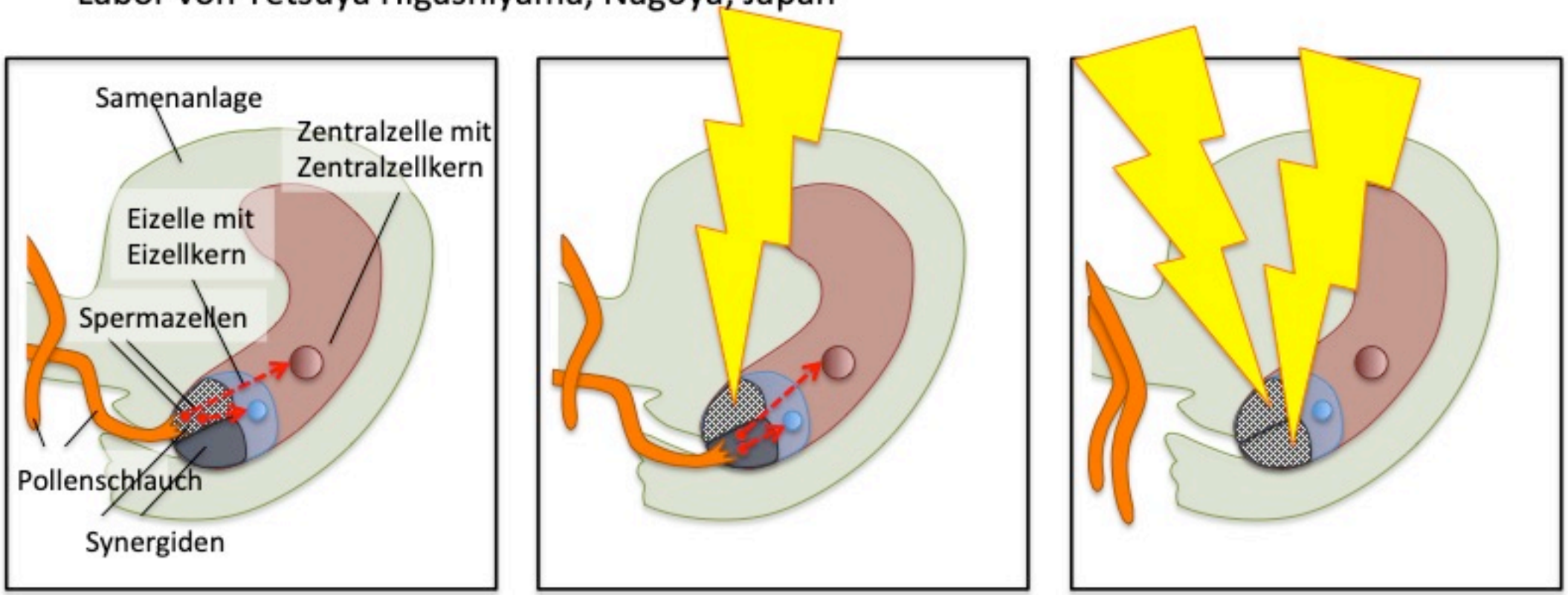
POP2 kodiert für eine Transaminase zur GABA Degradation.
Die *pop2* Mutante kann GABA nicht mehr abbauen.



Bouché et al. TRENDS in Cell Biology Vol.13 No.12 2003

Laserablation

Labor von Tetsuya Higashiyama, Nagoya, Japan

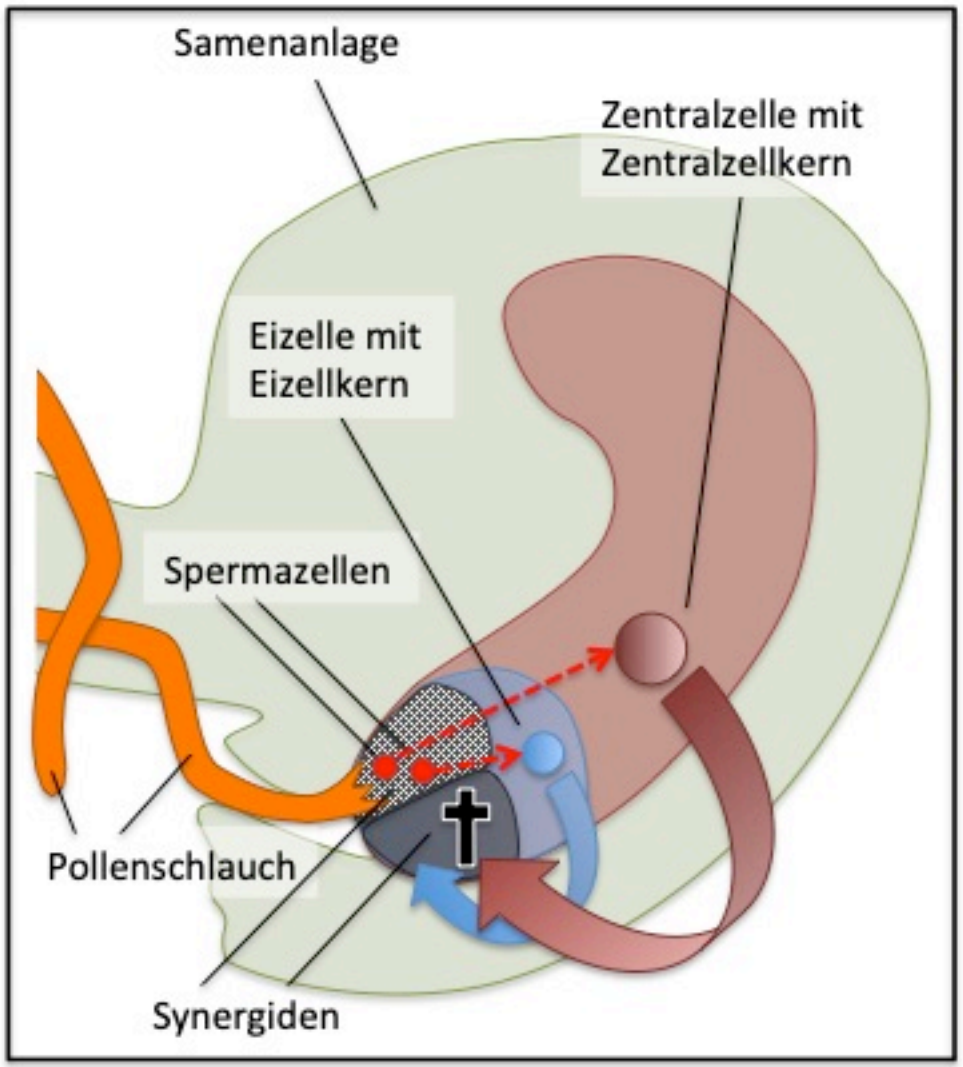


➔ Signalmoleküle werden von den Synergiden sekretiert und vom Pollenschlauch erkannt

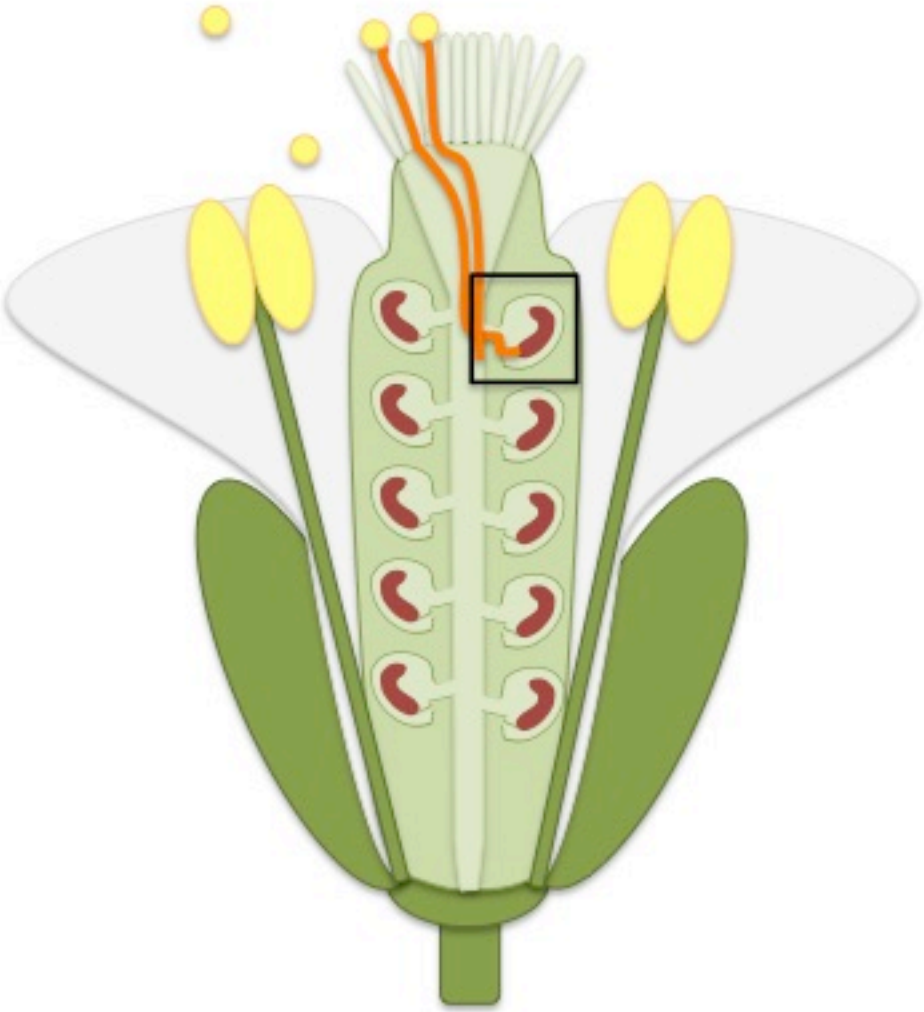
➔ Warum werden nicht mehr Pollenschläuche (Polyspermie) von den Samenanlagen angelockt?

Verhinderung von Polyspermie

Eine erfolgreiche Befruchtung der Zentralzelle und der Eizelle löst additives Signal aus, das zum **Zelltod der verbleibenden Synergide** führt. Das Pflanzenhormon **Ethylen** (➔VL Zelltod und Seneszenz) dient hierbei als Signalstoff.

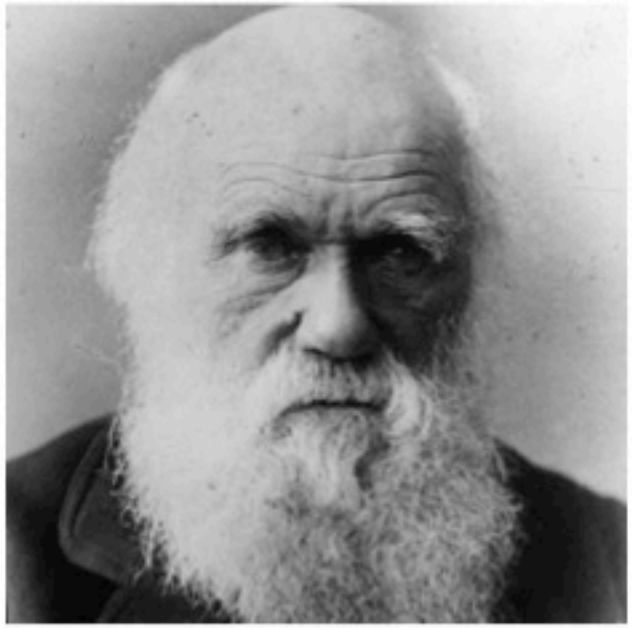


Etappen der Pollenschlauchanlockung



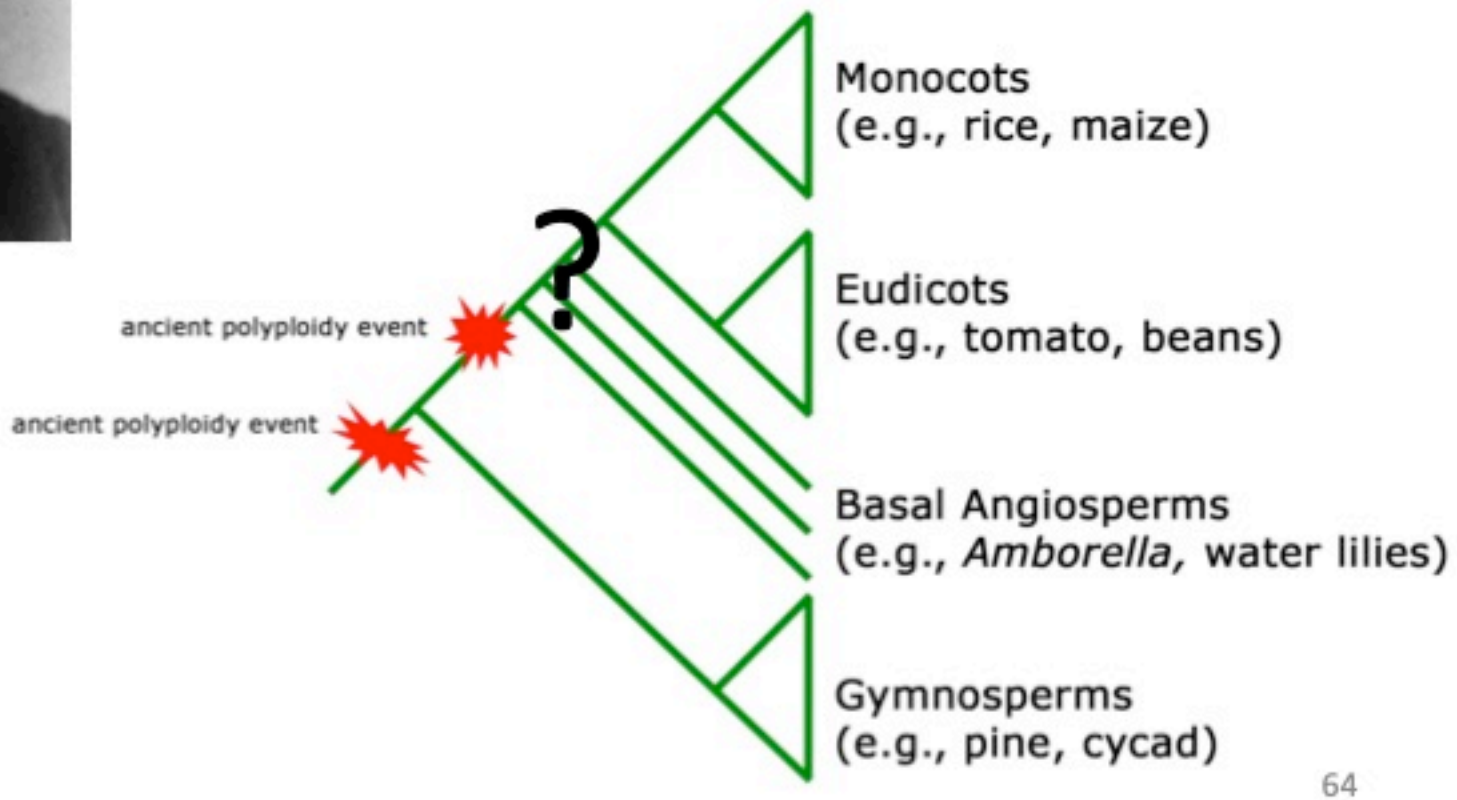
1. **Sporophytische Kontrolle** der Keimung
2. **Sporophytisches Leiten** des Pollenschlauchwachstums im Plazentagewebe und dem Funikulus
3. Sporophytisches Anlocken zur Samenanlage (**Funikuläre Anlockung**)
4. Mikrophylare Anlockung durch die Synergiden (**Gametophyten**)
5. **Aktives Abschaltes** der mikropylaren Anlockung

Ursprung der Angiospermen und der Doppelten Befruchtung - *The Abominable Mystery*



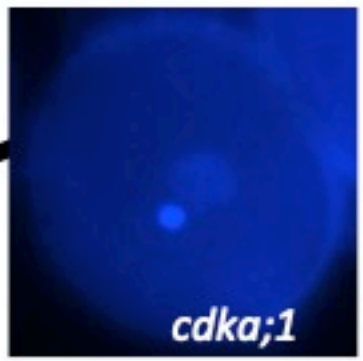
"…The rapid development, as far as we can judge, of all the higher plants within recent geological time is an abominable mystery…"

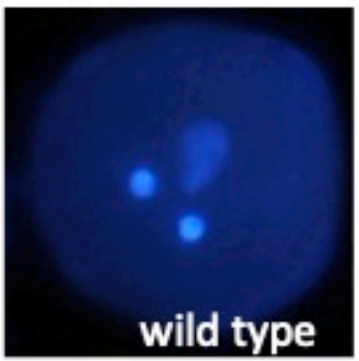
(**Darwin**, 1879, in einem Brief an Joseph Hooker)

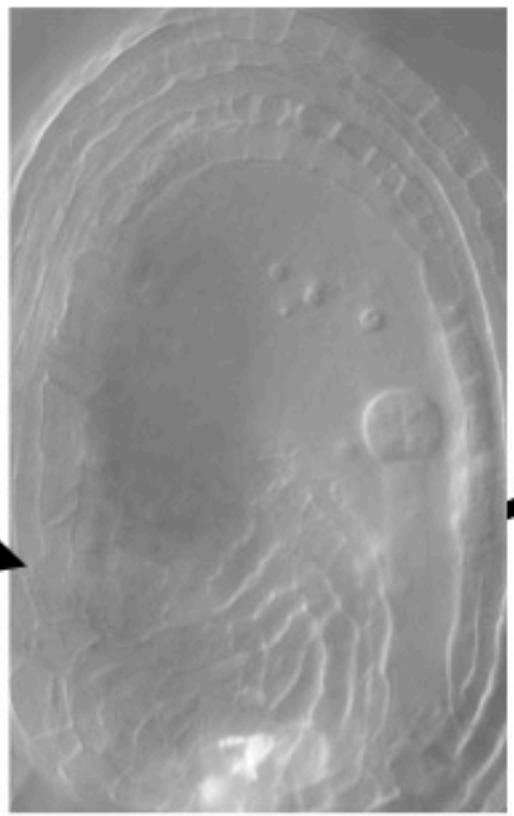


Braucht man eine Doppelte Befruchtung in Arabidopsis?

Nowack et al. 2006. Nature Genetics, 38, 63-7.

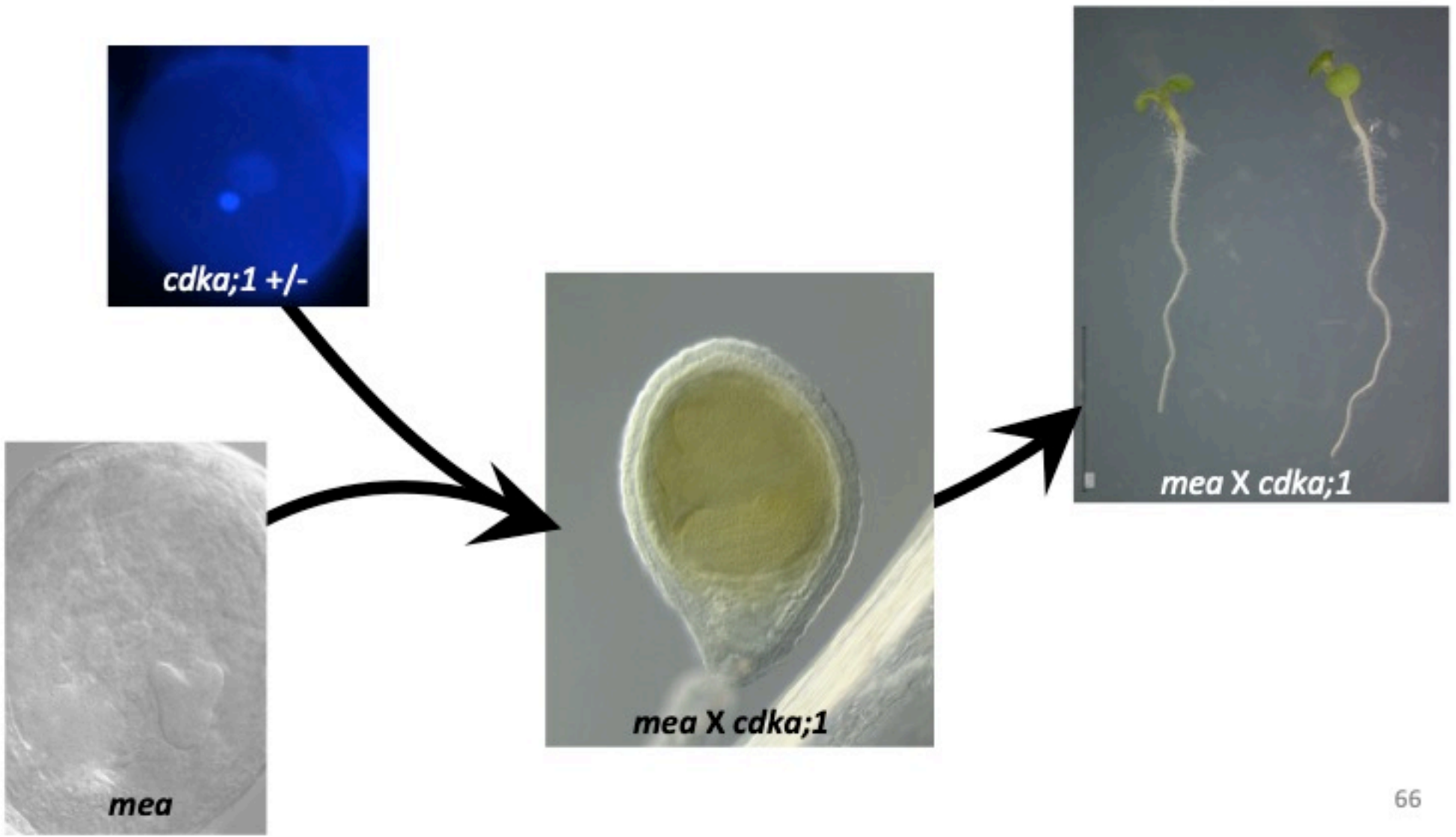






Braucht man eine Doppelte Befruchtung in Arabidopsis?

Nowack et al. 2007. Nature, 447, 312-5.



Grundlagen und Konzepte

- Lebenszyklus der Pflanze
- Entwicklung des weiblichen Gametophyten
- Entwicklung des männlichen Gametophyten
- Bestäubung und Befruchtung
- **Frühe Embryogenese**

Fundamentale Fragen der Embryogenese

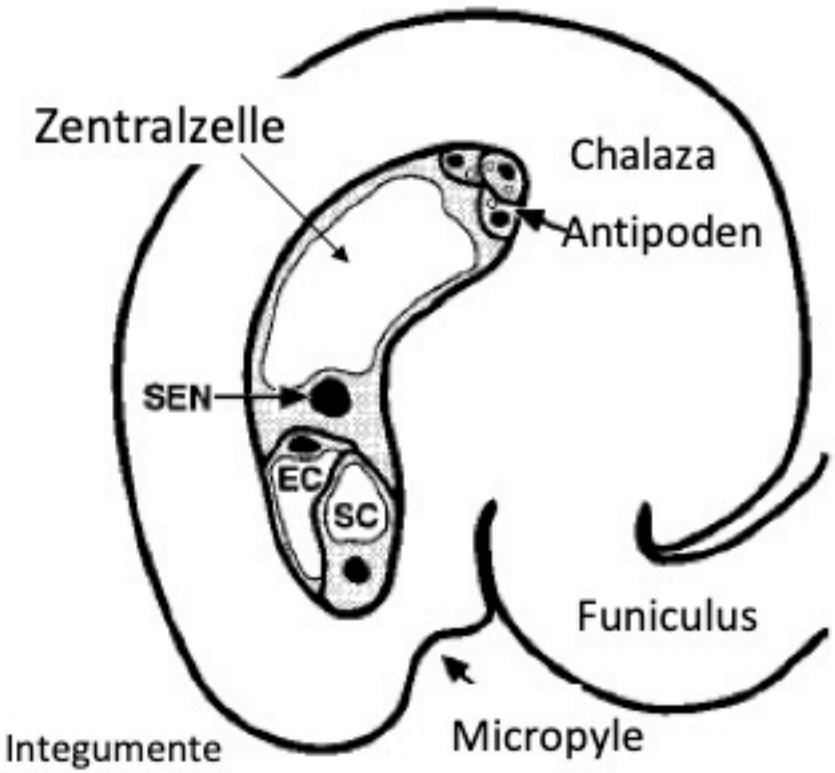
1. Wie entwickelt sich aus einer befruchteten Eizelle einer mehrzelliger Organismus?

2. Wie wird von einem gametophytischen Genexpressionprogramm auf ein zygotisches Programm umgeschaltet?

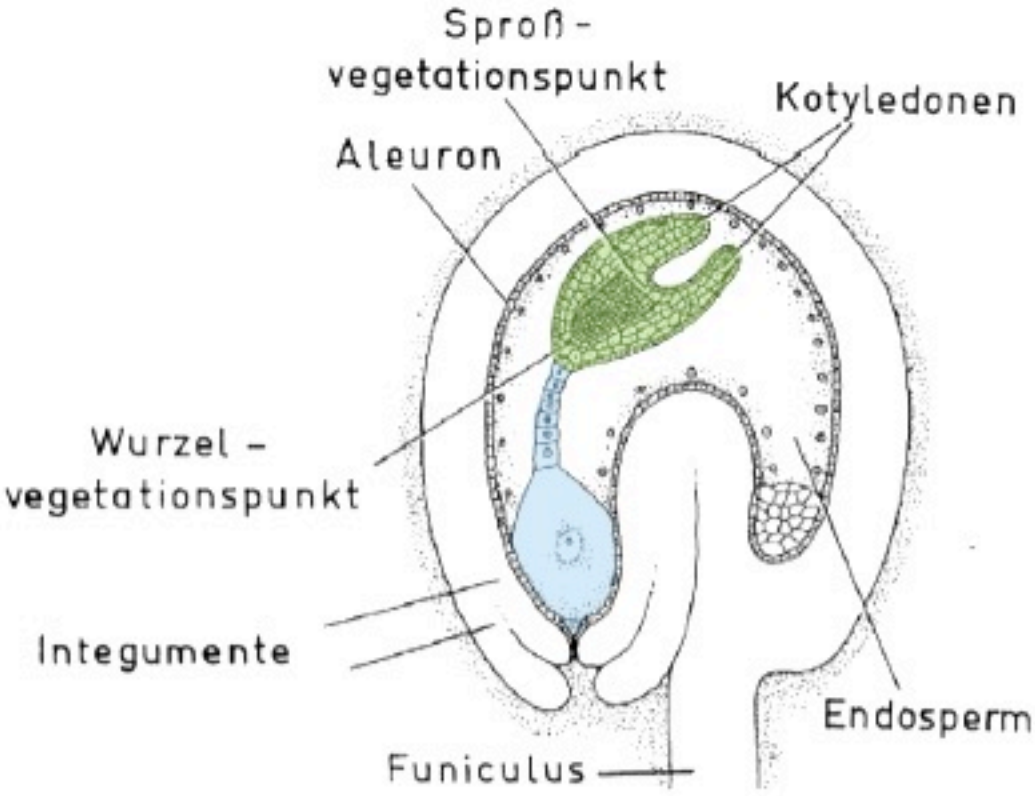
3. Wie werden die verschiedenen Zelltypen und Gewebe spezifiziert?

Der Embryo ist durch den Suspensor mit dem maternalen Gewebe verbunden

unbefruchtete Samenanlage



Samenanlage mit Embryo



SC=Synergiden

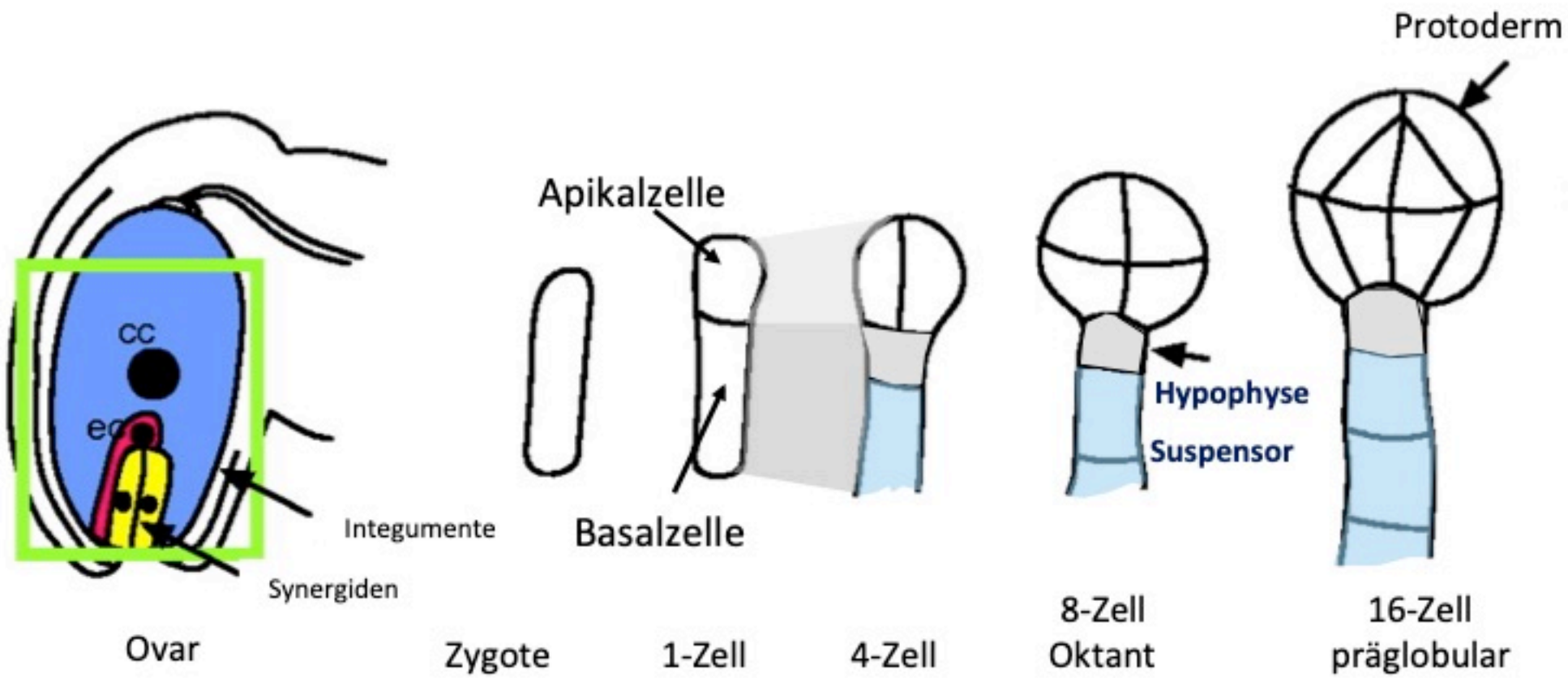
EC=Eizelle

SEN=Sekundärer Endospermkern

Embryo (*embryo proper*)

Suspensor

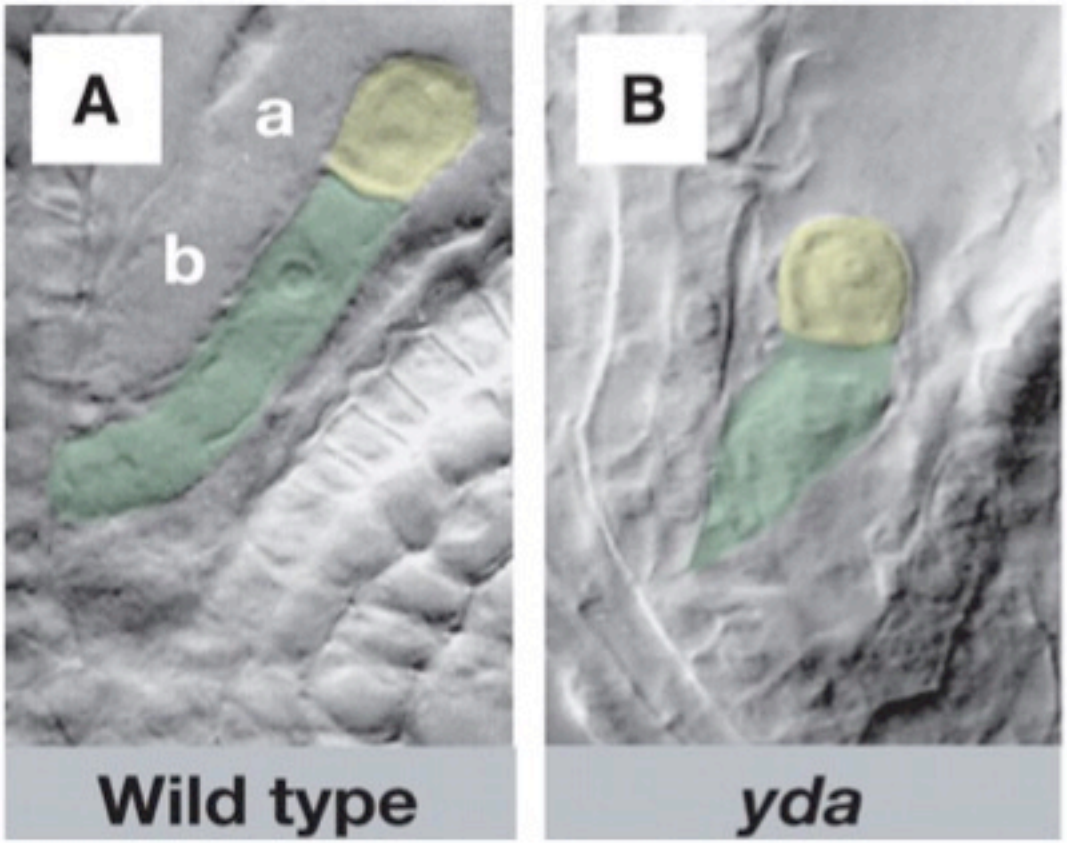
Frühe Embryogenese



Die erste Zellteilung der Zygote ist **asymmetrisch**

Haecker, A. et al. Development 2004;131:657-668

Mutanten mit gestörter Elongation der Basalzelle

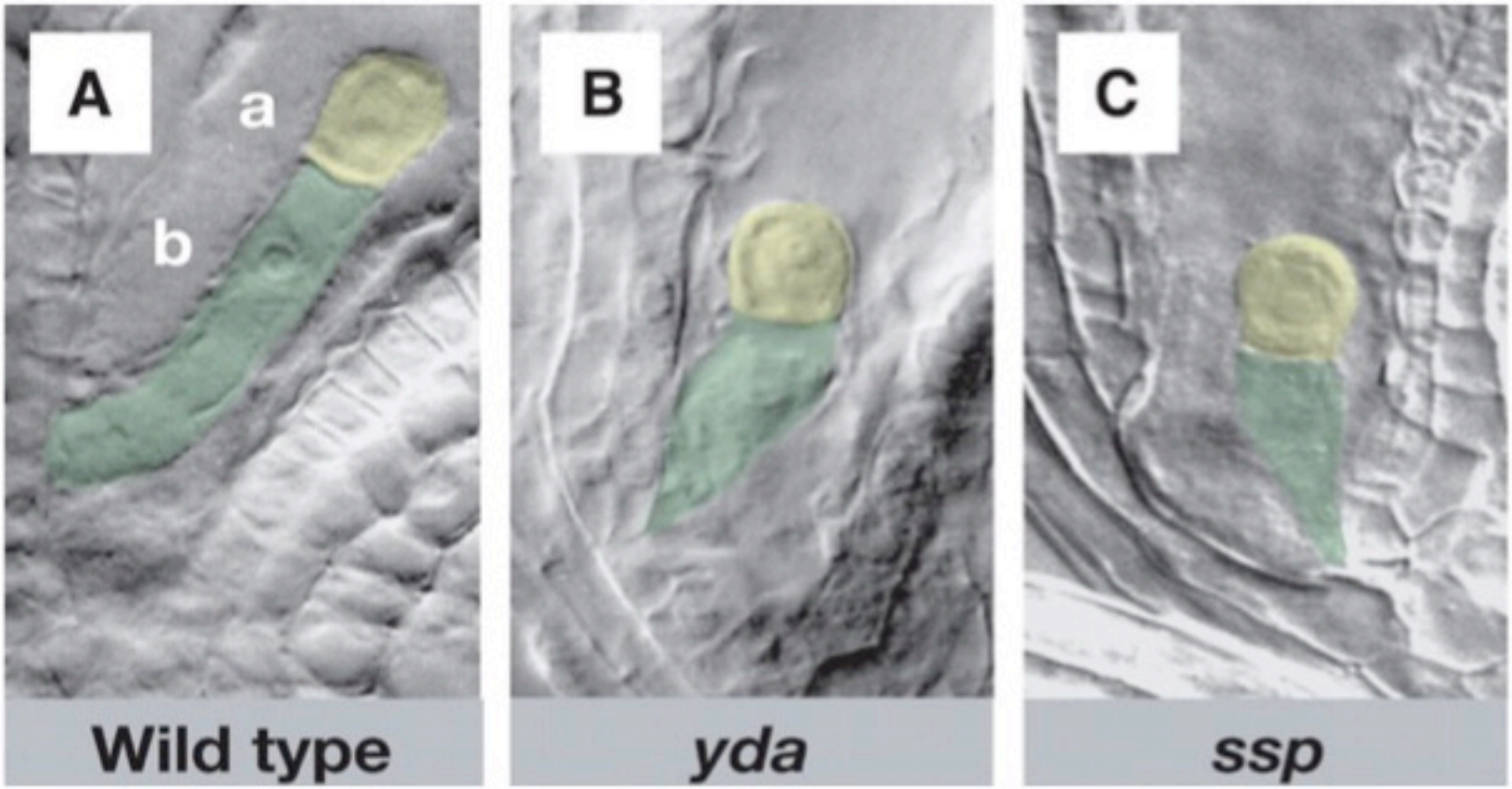


yoda

(Protein Kinase)

Bayer et al. Science 2009)

Mutanten mit gestörter Elongation der Basalzelle



yoda

(Protein Kinase)

short suspensor

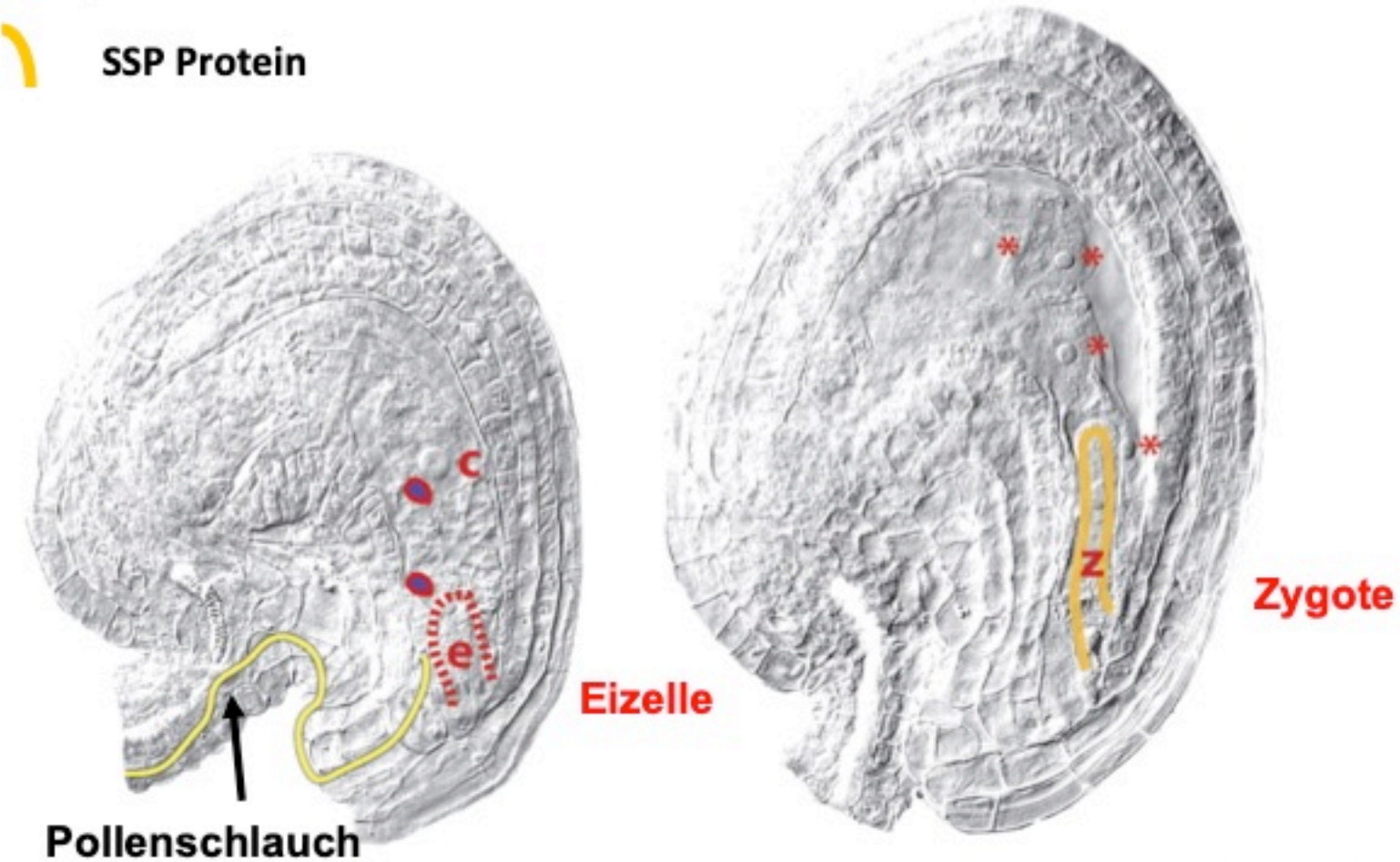
(membranassozierte Proteinkinase)

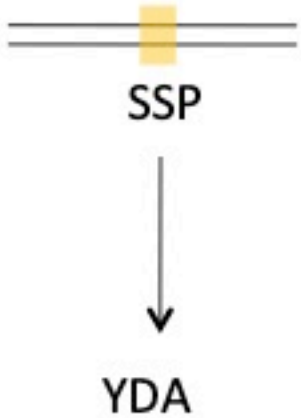
Bayer et al. Science 2009)

Paternale Kontrolle der Musterbildung im Embryo: Aktivierung der Kinase*YDA* durch *SSP*

Spermazelle mit **SSP mRNA**

SSP Protein

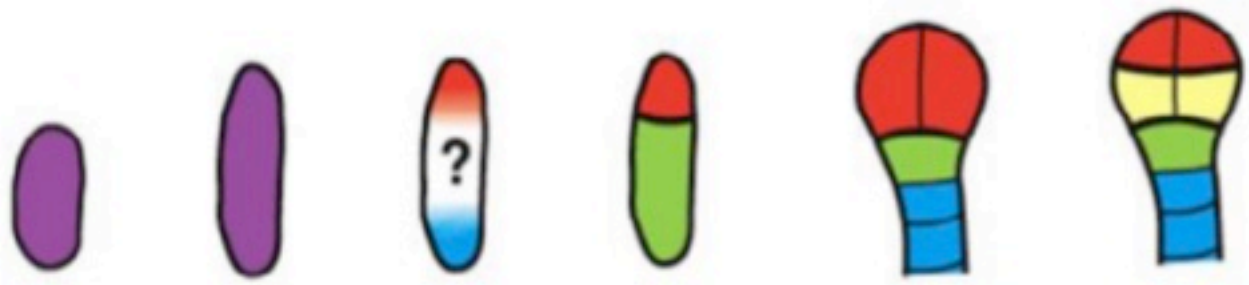




Die SSP mRNA wird von der Spermazelle geliefert und erst in der Zygote in das Protein translatiert ➔Paternale Kontrolle

Jeong S et al. J. Exp. Bot. 2010

Musterbildung im Embryo durch räumlich getrennte Expression von Transkriptionsfaktoren

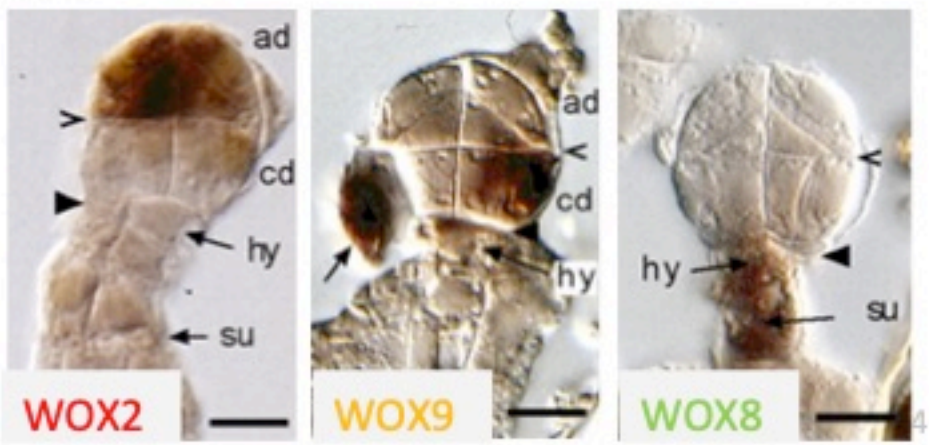


Eizelle | Zygote | 1-Zell | 4-Zell | 8-Zell Oktant

WOX = WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX

WOX2 and WOX8
WOX2
WOX8

WOX8 and WOX9
WOX9



„in situ Hybridisierung" zum Nachweis bestimmter mRNAs direkt im Gewebe

Werr 2005

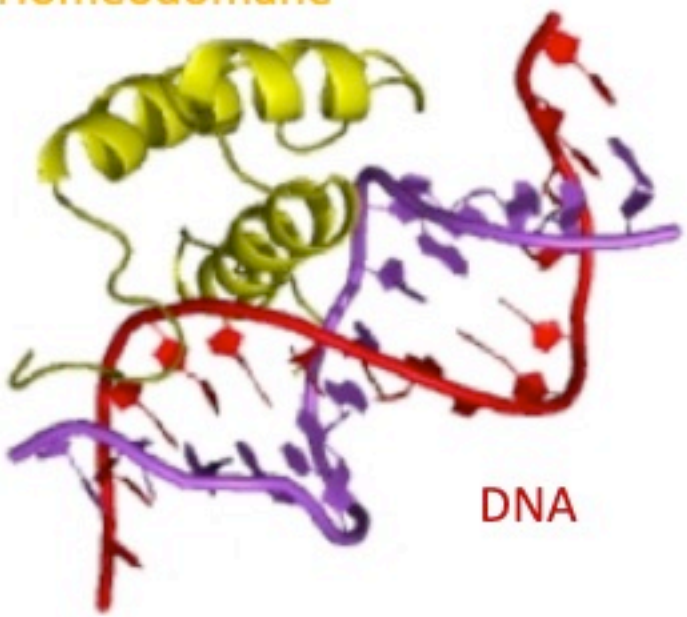
WOX-Gene kodieren für Transkriptions-faktoren mit einer Homeodomäne

WOX
(WOX = WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX)
Transkriptionsfaktoren

wuschel (*wus*) Mutante

Homeodomäne mit
Helix-Turn-Helix Motiv

Homeodomäne

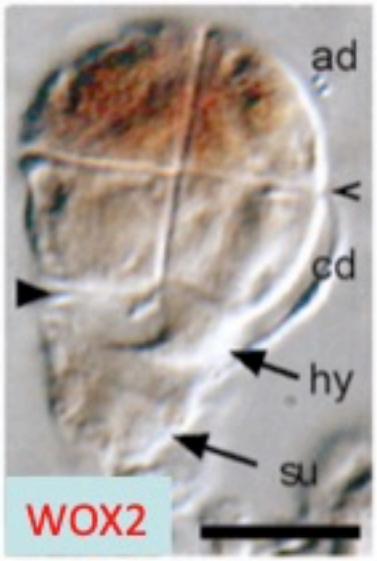


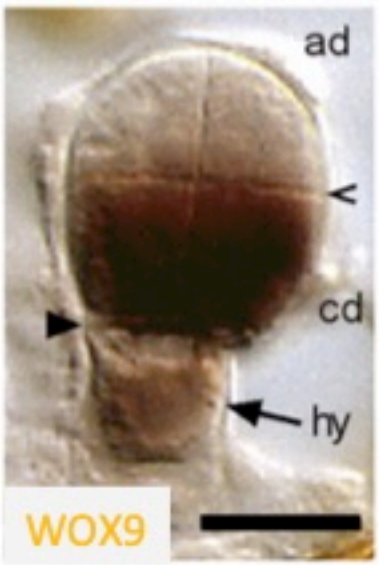
Aminosäuresequenzen der
Homeodomänen von WUS und WOX Proteinen

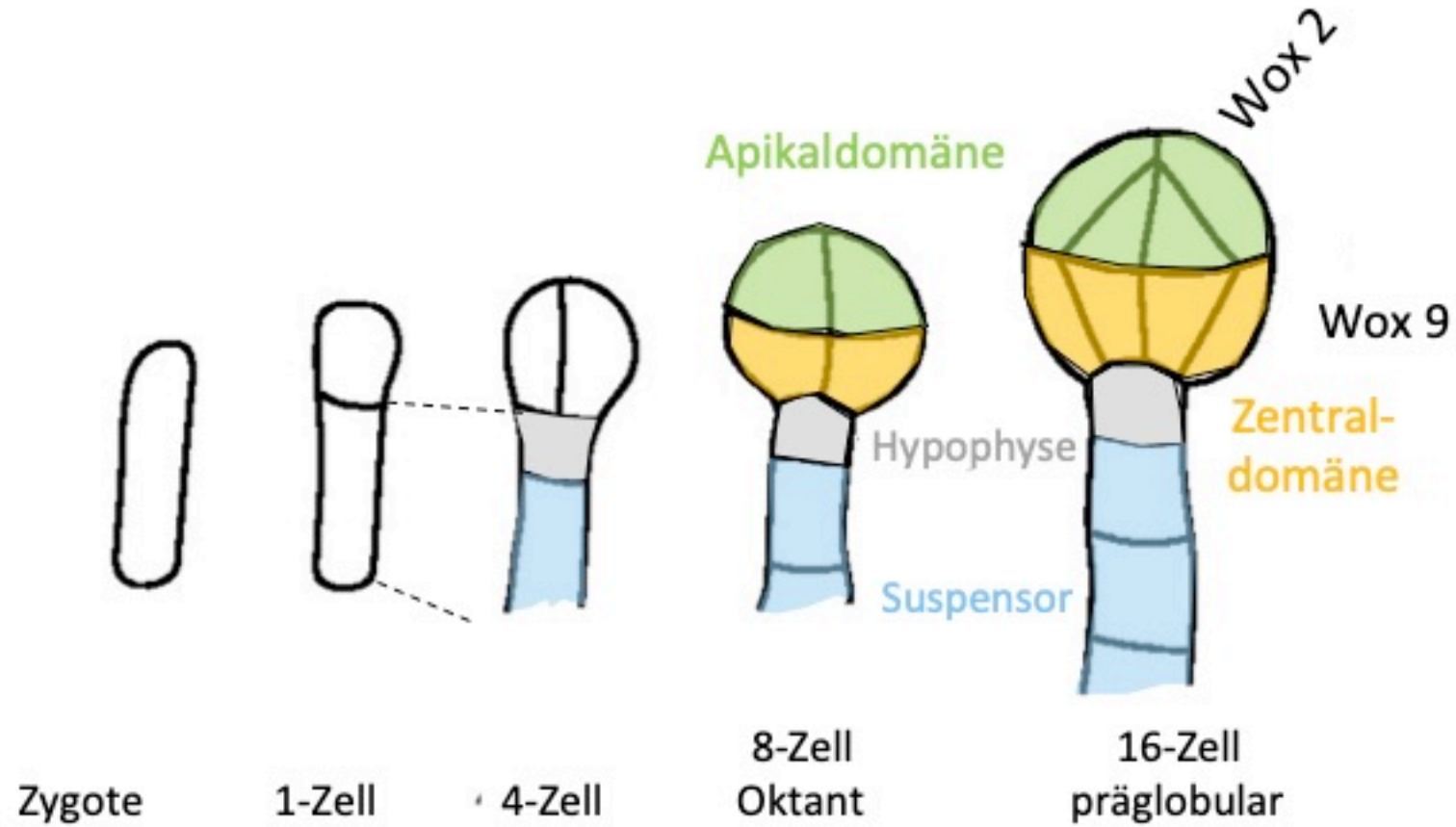
Haecker, A., et al. Development 2004

Expressionsdomänen von Entwicklungsgenen sind sehr oft anatomisch nicht zu erkennen

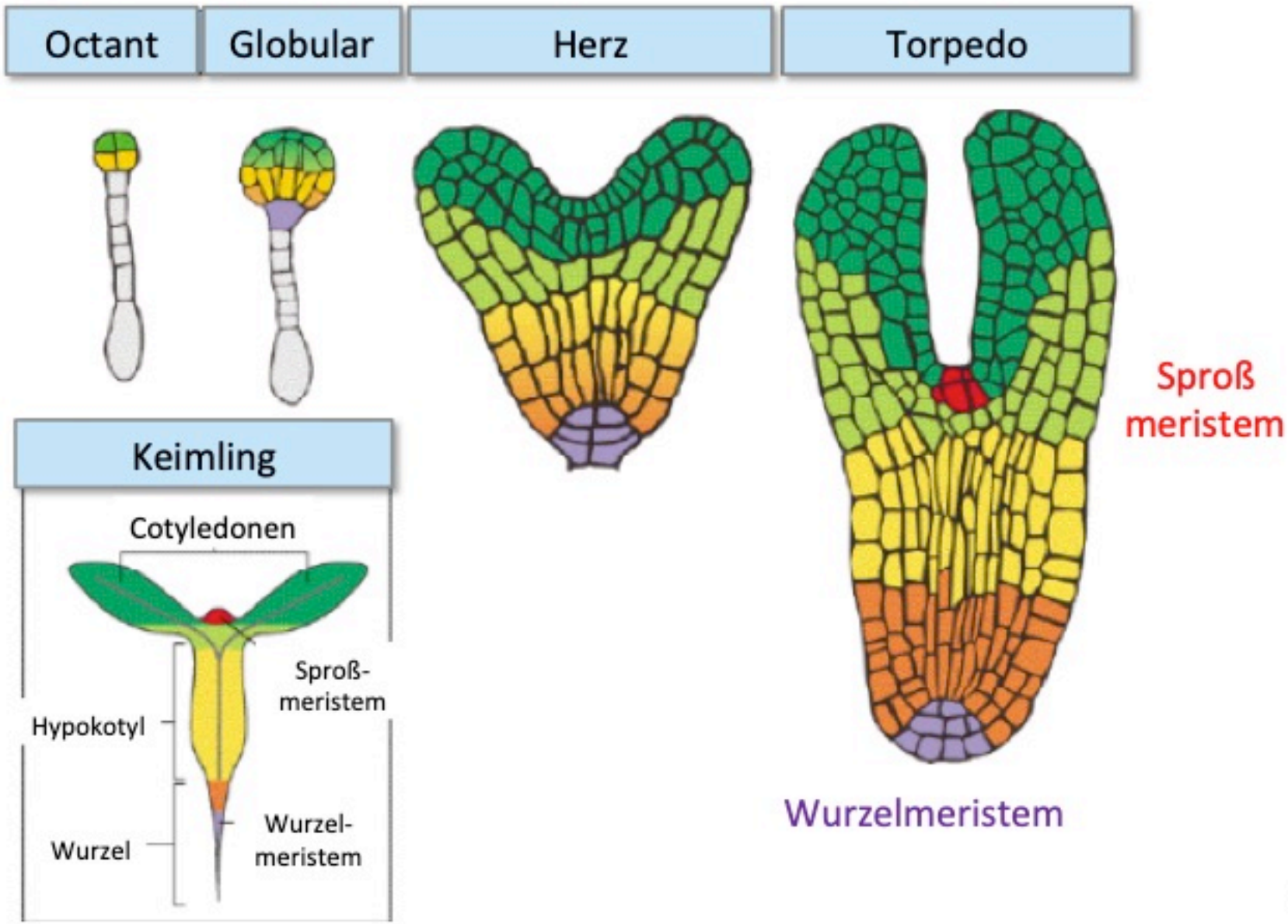
Mit „Markergenen“ können Entwicklungsdomänen erkannt werden







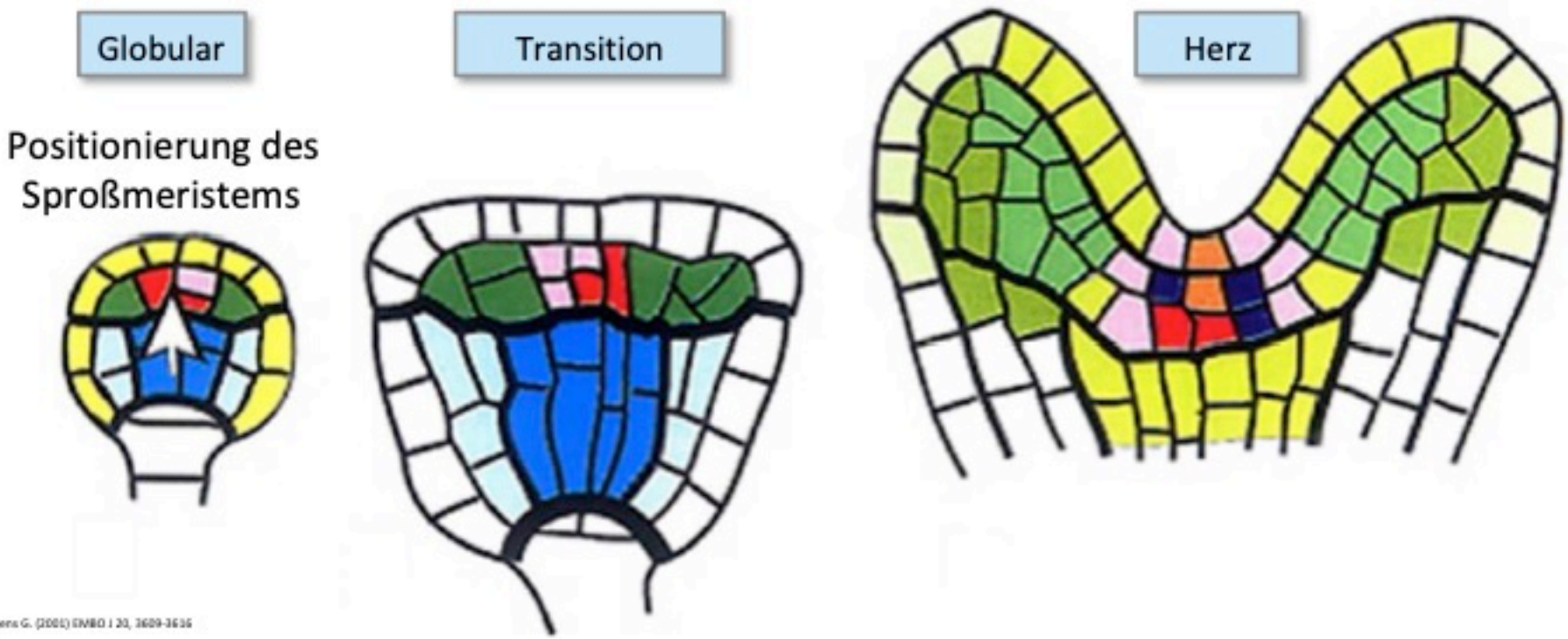
Gewebedifferenzierung während der Embryogenese



Werr 2005

Expressionsmuster verschiedener Entwicklungsgene während der Embryogenese

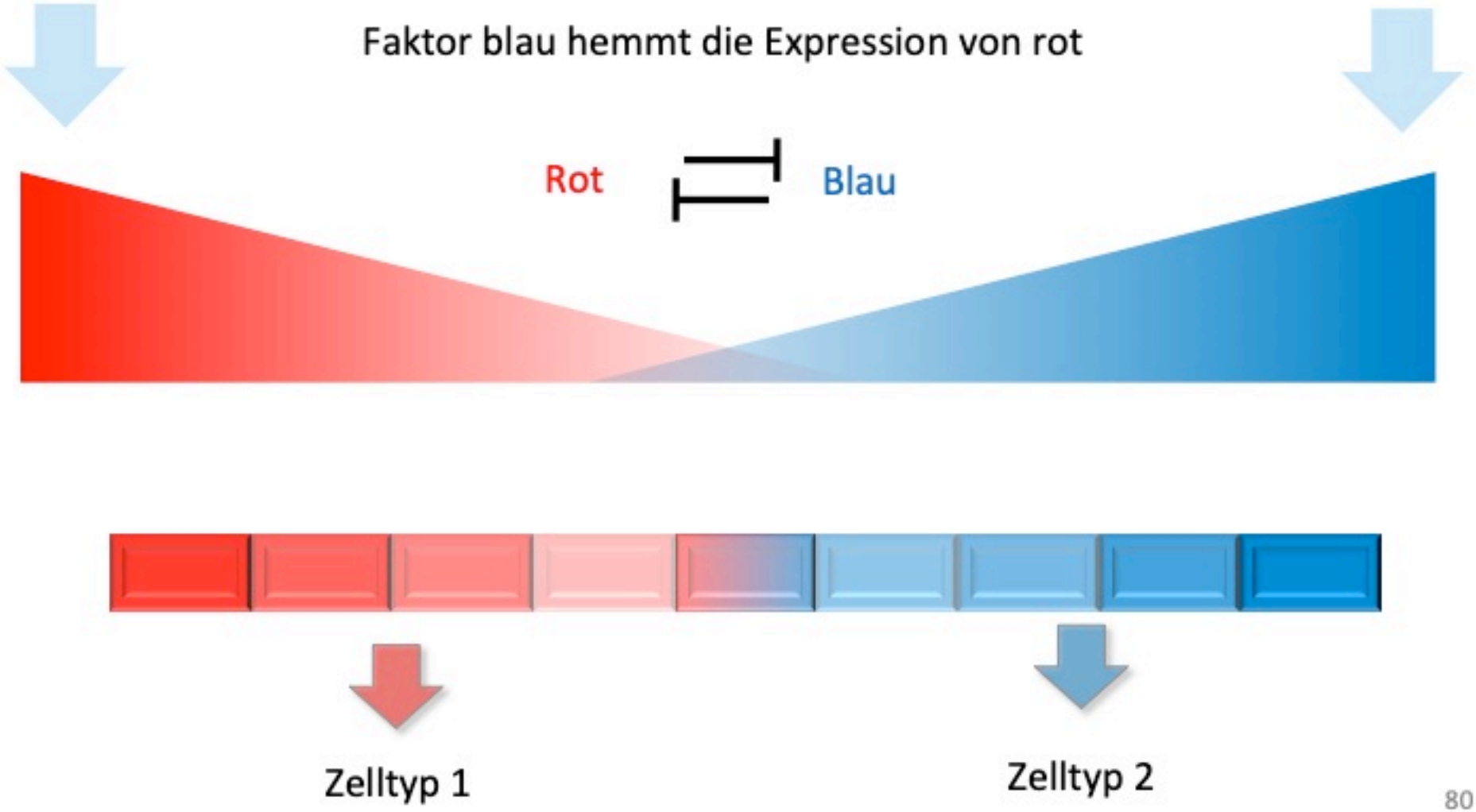
Einige dieser Gene werden nur in wenigen Zellen exprimiert!



Vereinfachtes Modell zur Musterbildung durch räumlich begrenzte Genexpression

Faktor rot hemmt die Expression von blau

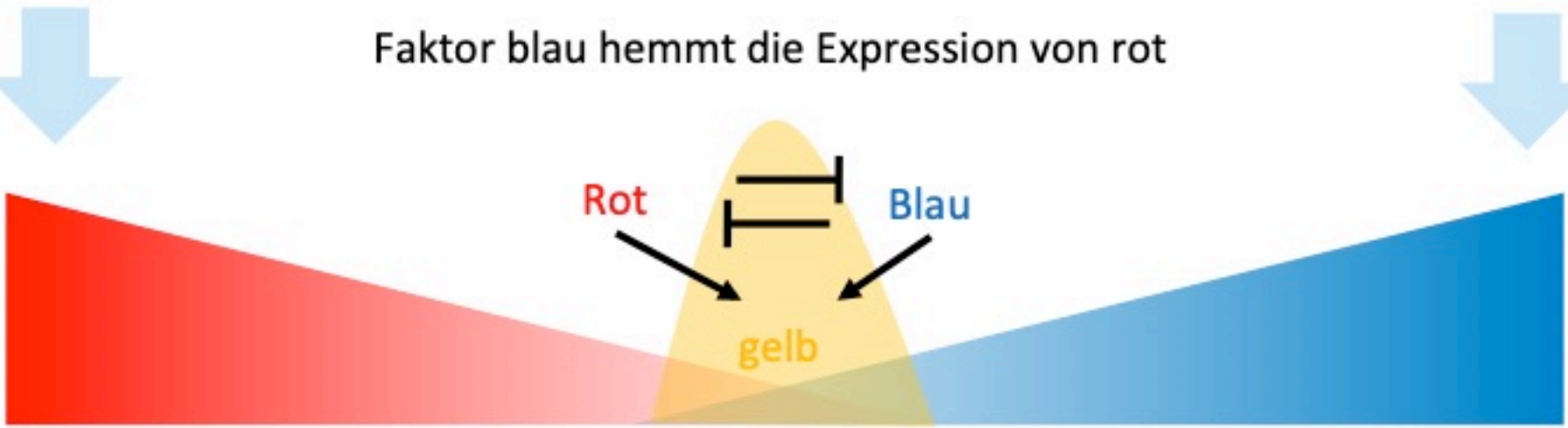
Faktor blau hemmt die Expression von rot



Vereinfachtes Modell zur Musterbildung durch räumlich begrenzte Genexpression

Faktor rot hemmt die Expression von blau

Faktor blau hemmt die Expression von rot

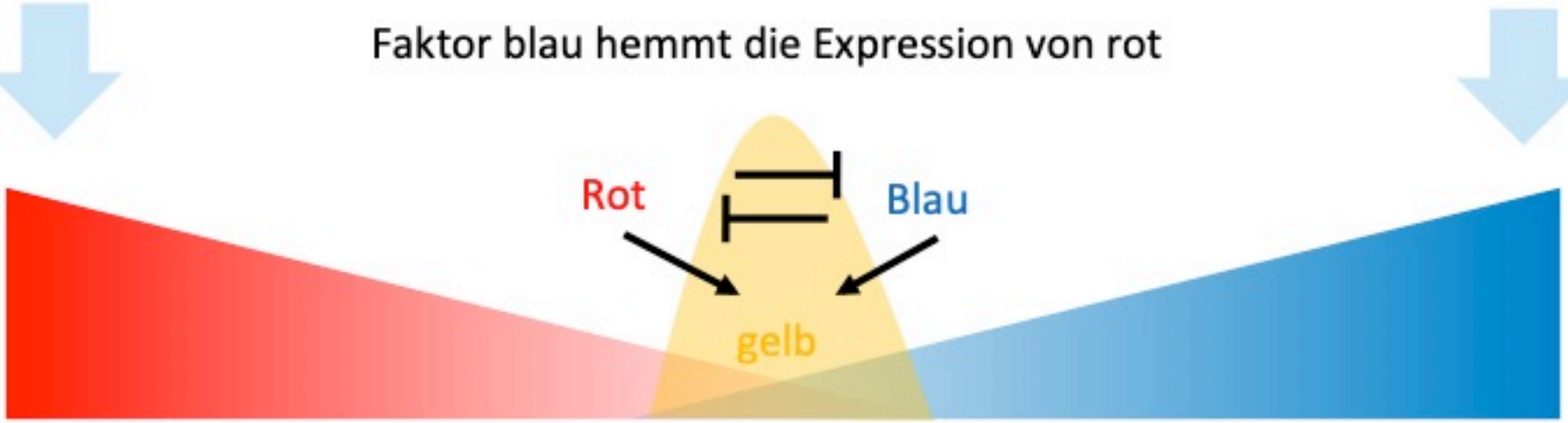


blau und rot aktivieren **nur gemeinsam** die Expression von Faktor gelb

Vereinfachtes Modell zur Musterbildung durch räumlich begrenzte Genexpression

Faktor rot hemmt die Expression von blau

Faktor blau hemmt die Expression von rot



blau und rot aktivieren **nur gemeinsam** die Expression von Faktor gelb

Vereinfachtes Modell zur Musterbildung durch räumlich begrenzte Genexpression

eine Serie induktiver Interaktionen erzeugt verschiedene Zelltypen

➔ **Musterbildung durch sequentielle Induktion**

Die Embryoentwicklung wird durch Auxin-Signalisierung gesteuert

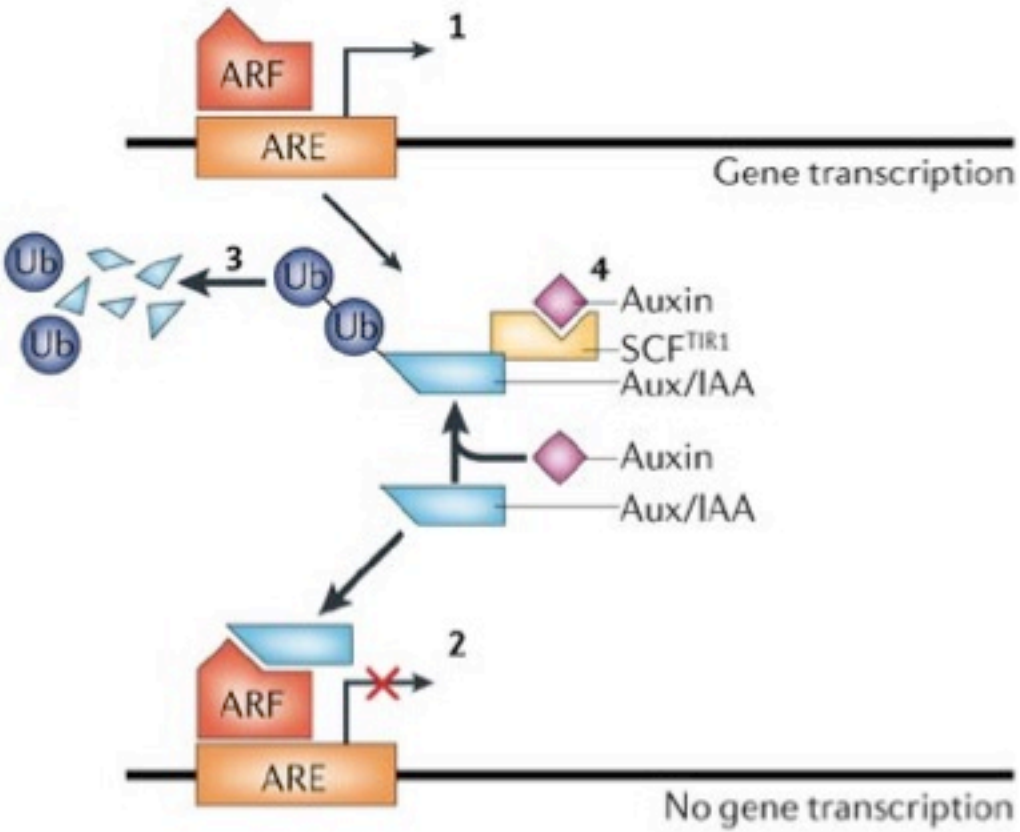
monopteros (*mp*)

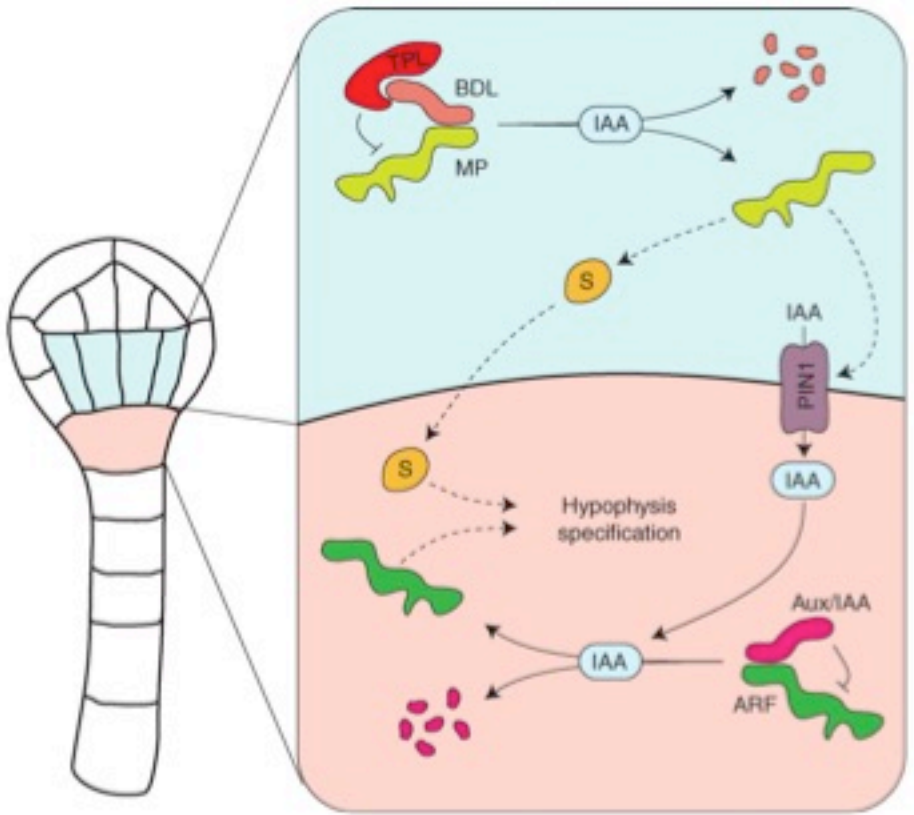
MONOPTEROS kodiert für einen Regulator auxin-abhängig exprimierter Gene

bodenlos (*bdl*)

Pflanzen können nicht mehr auf Auxin reagieren

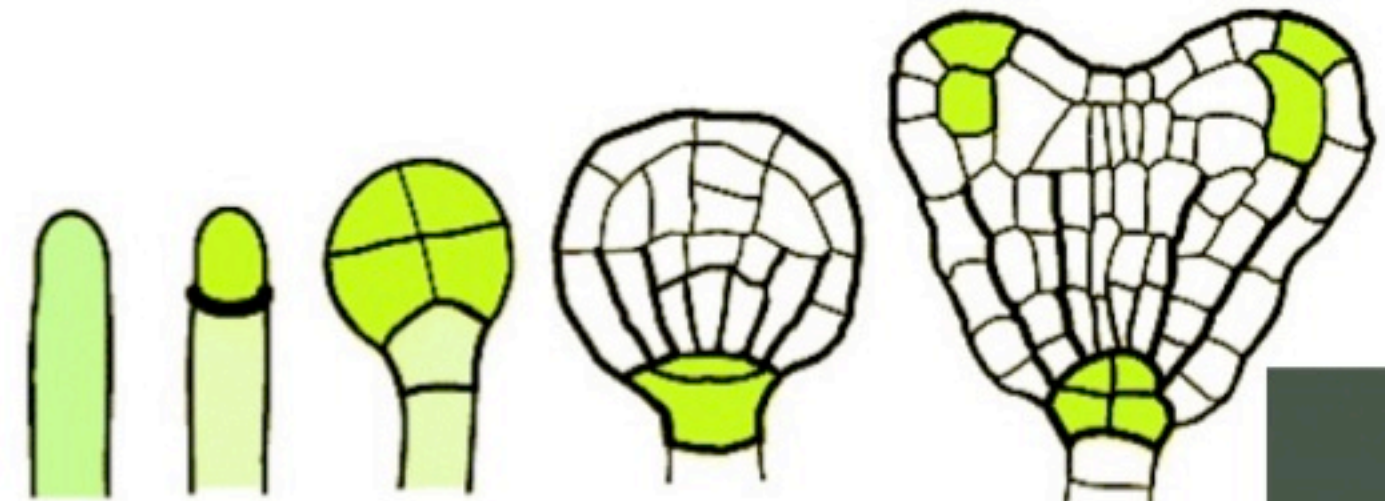
ARF Aktion





Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

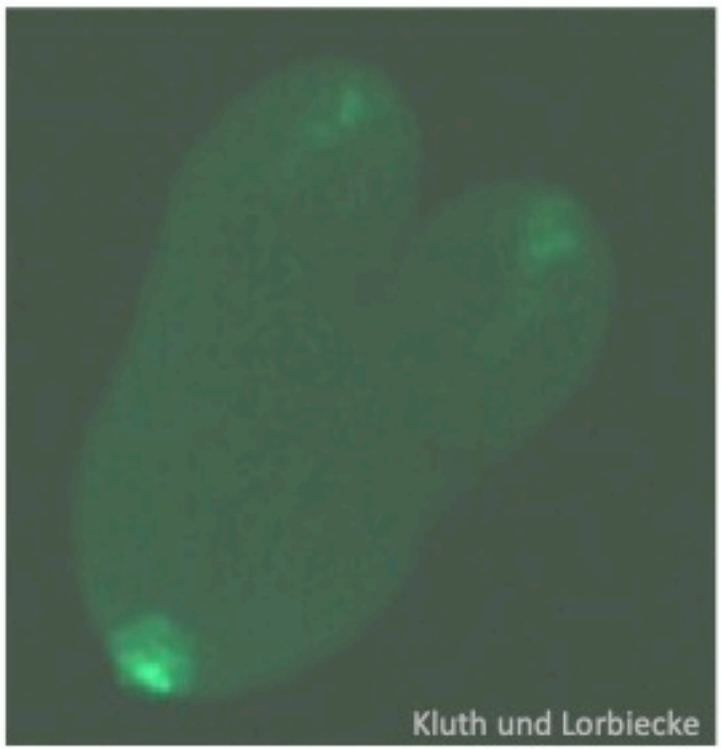
Die Embryoentwicklung wird durch Auxin-Signalisierung gesteuert



Willemsen & Scheres 2004

wenig Auxin

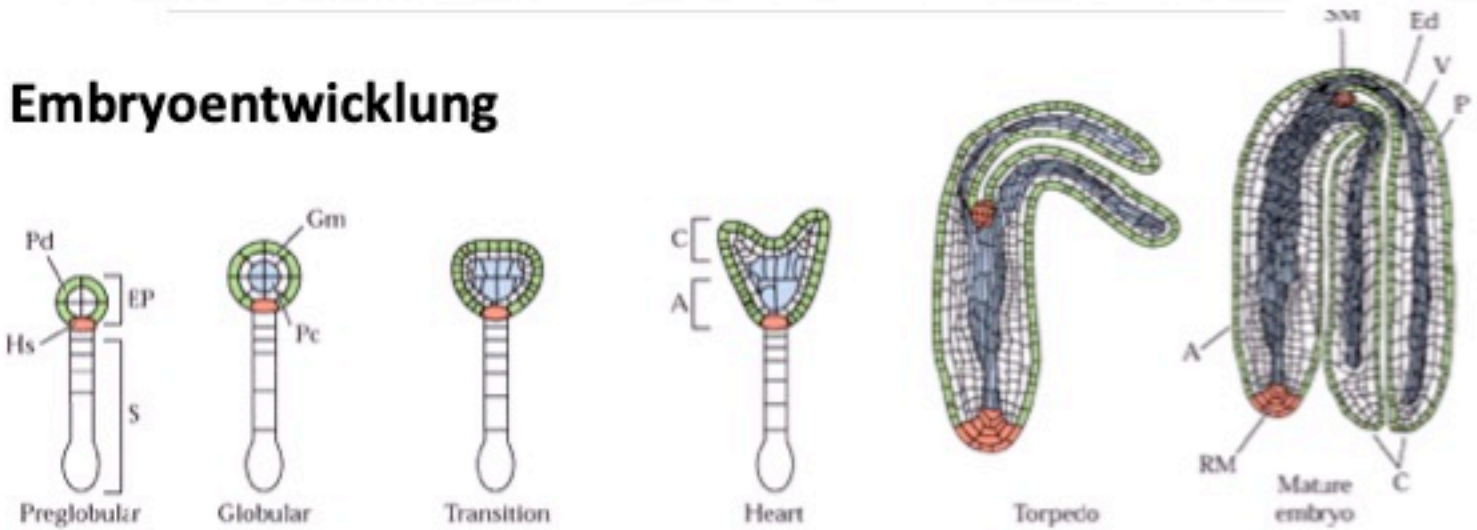
viel Auxin



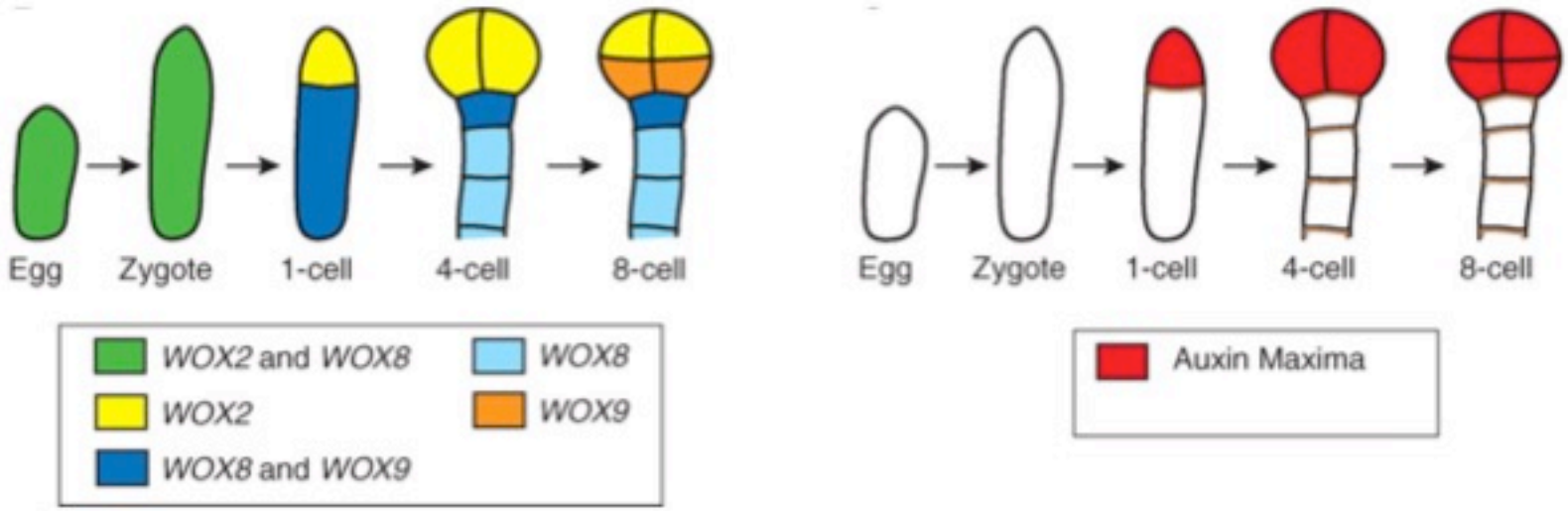
Auxin-induzierte Expression des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in transgenem *Arabidopsis* Embryo

Zusammenfassung Embryogenese

Embryoentwicklung



asymmetrische Lokalisation von Entwicklungsfaktoren



Entwicklungsgene

Phytohormon-Signalisierung

Ende Teil II